

Aus der Strahlenklinik der Universität in Marburg  
Direktor: Prof. Dr. R. du Mesnil de Rochemont  
und dem Laboratorium für Elektronenmikroskopie  
der Universität Marburg  
Leiter: Prof. Dr. W. Vogell

---

Elektronenmikroskopische Studie  
über verschiedene  
Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden  
am lymphoretikulären Gewebe  
der Rattenlymphknoten

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Rüdiger Pfab

aus Mährisch-Schönberg

Marburg 1967



Aus der Strahlenklinik der Universität in Marburg  
Direktor: Prof. Dr. R. du Mesnil de Rochemont  
und dem Laboratorium für Elektronenmikroskopie  
der Universität Marburg  
Leiter: Prof. Dr. W. Vogell

---

Elektronenmikroskopische Studie  
über verschiedene  
Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden  
am lymphoretikulären Gewebe  
der Rattenlymphknoten

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Rüdiger Pfab

aus Mährisch-Schönberg

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Marburg am 29. Juni 1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. et Dr. med. dent. Hans Heuser

Referent: Prof. Dr. W. Vogell

Correferent: Prof. Dr. R. du Mesnil de Rochemont

## Inhaltsverzeichnis

|                                                               | Seite |
|---------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                                    | 1     |
| Material                                                      | 3     |
| Methode                                                       | 9     |
| Ergebnisse                                                    | 13    |
| I. <u>Die Formolfixierung</u>                                 | 13    |
| Kontrastierung mit Bleiacetat                                 | 13    |
| Kontrastierung mit Bleihydroxid                               | 14    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat                               | 15    |
| Kontrastierung mit Osmiumtetroxid                             | 15    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat gefolgt von<br>Bleihydroxid   | 16    |
| Kontrastierung mit Osmiumtetroxid gefolgt von<br>Bleihydroxid | 16    |
| II. <u>Die Doppelfixierung Formol und Uranylacetat</u>        | 17    |
| Kontrastierung mit Bleiacetat                                 | 17    |
| Kontrastierung mit Bleihydroxid                               | 18    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat                               | 18    |
| Kontrastierung mit Kaliumpermanganat                          | 19    |
| III. <u>Die Formol-Osmiumtetroxid-Fixierung</u>               | 19    |
| Kontrastierung mit Bleihydroxid                               | 19    |
| IV. <u>Die Osmiumtetroxidfixierung</u>                        | 20    |
| Kontrastierung mit Bleiacetat                                 | 20    |
| Kontrastierung mit Bleihydroxid                               | 20    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat                               | 21    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat gefolgt von<br>Bleihydroxid   | 21    |
| V. <u>Die Glutaraldehydfixierung</u>                          | 21    |
| Kontrastierung mit Bleiacetat                                 | 22    |
| Kontrastierung mit Bleihydroxid                               | 23    |
| Kontrastierung mit Uranylacetat                               | 23    |
| Diskussion                                                    | 25    |
| Zusammenfassung                                               | 33    |
| Literaturverzeichnis                                          | 34    |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## Einleitung

In den letzten Jahren werden zunehmend verschiedene Fixierungs- und Kontrastierungsmittel für elektronenmikroskopische Untersuchungen herangezogen. Das Ziel aller dieser Untersuchungen ist, bei Erhaltung der natürlichen Strukturen der Zelle Kontrastunterschiede in den einzelnen morphologischen Elementen zu erhalten. Dabei spielt die unterschiedliche Affinität der Kontrastmittel zu bestimmten Gewebskomponenten eine grosse Rolle (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>).

Die Wirkungsweise der meisten in das Gewebe eindringenden Mittel ist weitgehend unbekannt, so dass allein der Vergleich verschiedener Techniken und der damit erhaltenen Resultate über die Güte eines Fixierungs- oder Kontrastierungsmittels oder deren Kombination entscheidet.

Das in der Elektronenmikroskopie heute gebräuchlichste Fixierungsmittel ist Osmiumtetroxid (PALADE<sup>60</sup>). Es ist in wässriger Lösung ein starkes Oxydationsmittel (vgl. MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) und kann zusätzlich Gewebskomponenten extrahieren. Die bei der Fixierung des Gewebes mit Osmiumtetroxid entstehenden niederen Oxydationsstufen (Osmiumdioxid bzw. metallisches Osmium) sind wasserunlöslich und bewirken infolge ihres Schwermetallcharakters eine Kontrastierung verschiedener Gewebskomponenten, die man als osmiophile Strukturen bezeichnet.

Sehr wesentliche Erkenntnisse im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung von Strukturelementen der Zelle wurden durch die Einführung der Formolfixierung in der Elektronenmikroskopie erzielt (HOLT, HICKS<sup>33</sup>). Im Gegensatz zur Osmiumtetroxidfixierung erfolgt bei der Formalinfixierung keine Vorkontrastierung des Gewebes, so dass hier durch die Anwendung selektiv wirkender Kontrastierungsmittel die Möglichkeit einer elektronenmikroskopischen "Färbung" besteht. Ausserdem kann das Formalin in Kombination mit Osmiumtetroxid verwendet werden. Bei geeigneter Kombination von fixierenden und kontrastierenden Mitteln bei der Ge-

websfixierung konnten substanzspezifische Unterschiede in der elektronenoptischen Dichte verschiedener Strukturelemente beobachtet werden (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>).

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden ausserdem als Fixierungsmittel Kaliumpermanganat (LUT<sup>48</sup>, WETZEL<sup>87</sup>), Chromosmiumsäure (DALTON<sup>17</sup>), Glutaraldehyd (SABATINI, MILLER, BENSCH, BARNETT<sup>5,67,68,69</sup>) sowie Akrolein (MARINOZZI<sup>50</sup>) benutzt.

Als Kontrastmittel haben sich zur Nachkontrastierung (Färbung) von Dünnschnitten Lösungen von Schwermetallverbindungen wie Bleihydroxid (18, 40, 45, 49, 50, 68, 69, 84, 85), Bleiacetat (18, 85), Uranylacetat (49, 50, 69, 84), Uranylnitrat (18), Osmiumsäure (49, 68), Bariumhydroxid und Kaliumpermanganat (42, 48) und Bleitartrat (54) als geeignet erwiesen.

MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> konnten mit der Anwendung verschiedener Fixierungen und Kontrastierungen bei der Untersuchung von Pankreas-, Nieren- und Lebergeweben eine Differenzierung der DNS- und RNS-Proteide im elektronenmikroskopischen Bild erhalten.

Bei den üblichen elektronenmikroskopischen Darstellungen stösst die Unterscheidung der DNS- und RNS-Proteide auf Schwierigkeiten. Als lohnendes Objekt für Kernstudien bietet sich die Plasmazelle an. An diesem Zelltyp lässt sich die Reifung einer Einzelzelle gut verfolgen, weil Immunisierungsvorgänge die Zelle zur Differenzierung zwingen. Ausserdem verfügt die reife Plasmazelle über die meisten elektronenmikroskopisch bekannten Zellbestandteile. Erwähnt sei noch, dass man die Plasmazellen als die eigentlichen Produktionsorgane der Gammaglobuline und Antikörper ansieht.

Zunächst soll die Feinstruktur der nach Reimmunisierung beobachteten Veränderungen im normalen Rattenlymphknoten beschrieben werden.

### Material

Als Untersuchungsmaterial wurden mit Brucellenantigen reimmunisierte Rattenlymphknoten benutzt. Zwischen der ersten und zweiten Antigengabe lagen 18 bis 36 Tage. Das Antigen wurde intraperitoneal verabreicht in einer Dosis von ca.  $9 \times 10^{11}$  abgetöteter Keime von *Brucella melitensis*.

### Die Zellformen des normalen Lymphknotens

Lymphknoten und Milz bilden die Hauptgruppe der lymphoretikulären Organe. Schon unter normalen Bedingungen ist das lichtmikroskopische Zellbild überaus mannigfaltig. Neben der Bildung von Lymphozyten, die selbst schon in verschiedenen Entwicklungs- und Funktionsformen vorkommen, treten andere Zellen auf, die immunbiologisch von grosser Bedeutung sind.

Vermehrte Zellbildung, funktionelle Belastung und Stress können jederzeit den normalen Zellbestand aktivieren und zu schwer zu differenzierenden Entwicklungsformen führen.

Im Anschluss an LENNERT<sup>44</sup> und STENDER<sup>72</sup> können im lymphoretikulären Gewebe in der Regel folgende Zellarten gefunden werden (vgl. Fig. 1,2a,2b):

#### 1. Die Retikulumzellen

Die kleine lymphoide Retikulumzelle (oder kleine Rundzelle) stellt eine pluripotente Stammform für die verschiedenen Retikulumzelldifferenzierungen und die lymphozytäre Reihe dar. Sie ist sehr wahrscheinlich identisch mit kleinen Lymphozyten oder bestimmten morphologisch gleich erscheinenden Zellen.

Speziellere Zelltypen sind die mittelgrosse Retikulumzelle als Ruheform und die grosse undifferenzierte Retikulumzelle, die bei Zellneubildung und funktioneller Belastung stärker in Erscheinung tritt (LENNERT<sup>44</sup>), ferner die Histiozyten. Die phagozytierenden Retikulumzellen stellen speziell differenzierte Formen dar.

## 2. Die Zellen der lymphozytären Reihe

Zu ihnen gehören die Lymphoblasten, mittelgrosse und kleine Lymphozyten, bei denen makronukleoläre Follikellymphozyten mit zentralem, grossen Nukleolus und Sinuslymphozyten als multinukleolärer Typ mit mehreren kleinen Nukleolen nach GRUNDMANN<sup>27</sup> unterschieden werden können.

## 3. Die Plasmazellen (Fig. 2b)

Sie kommen in normalen Lymphknoten seltener vor. Ihre Zahl nimmt bei der Sensibilisierung durch Antigene stark zu.

Die regelmässig im Lymphknoten zu findenden Granulozyten, unter denen die eosinophilen vorherrschen, stammen aus der Blutbahn.

## Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit steht die Darstellung der Strukturelemente in Zellen von Lymphknoten bei verschiedenen Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden im Vordergrund. Bei der vergleichenden Betrachtung wollen wir uns vor allem auf Retikulumzellen, Lymphozyten und Plasmazellen beschränken. Das erscheint notwendig, weil der elektronenmikroskopische Aspekt bei den verschiedenen Techniken sehr verschieden ausfällt, so dass der Vergleich schon bei gut zu definierenden Zellarten recht schwierig sein kann. Zunächst seien die wichtigsten ultrastrukturellen Besonderheiten der drei Zelltypen erwähnt.

### A. Die Retikulumzellen

Ausführlich haben SORENSON<sup>71</sup> und HAN<sup>28,29,30</sup> die Retikulumzelle ultrastrukturell beschrieben.

SORENSON<sup>71</sup> gibt folgende Kennzeichen der "Primitivzelle" an, die er als multipotente Zellform im Lymphknoten auffasst:

"These primitive cells have larger nuclei and more cytoplasm than lymphocytes. The nuclei are light and contain a large, loosely arranged nucleolus. Cytoplasm forms a rim of moderate width about the nucleus. The mitochondria are larger than lymphocytic mitochondria and have a less dense matrix.

A small Golgi zone mainly composed of a small round profiles with some parallel membranes is frequently observed. A few strands of ergastoplasm and many free ribonucleo-protein particles are within the cytoplasm." (S. 76).

HAN<sup>29</sup> beschreibt ausführlich die Ultrastruktur der von ihm als Stammzelle aufgefassten "undifferenzierten Retikulumzelle" (Fig. 1):

Gestalt unregelmässig, gewöhnlich länglich, mit zytoplasmatischen Fortsätzen. Zellmembranen oft undeutlich, besonders im Kontakt mit anderen Zellen. Das Zytoplasma zeigt gesprenkeltes Aussehen, die zytoplasmatischen Organellen sind wenig ausgeprägt. Das endoplasmatische Retikulum zeigt wenige Bläschen oder flache Säcke. Einige dichte Granula, die wie Ribosomen erscheinen, sind vorhanden. Die oval-elliptischen Mitochondrien haben unregelmässige Kontur, ihre Grösse schwankt. Die Cristae sind schwach entwickelt und wandständig angeordnet. Ein echter Golgiapparat kann nicht identifiziert werden, lediglich eine paranukleäre Anhäufung kleiner Bläschen. Der Nukleus variiert in der Form von sphärisch zu elliptisch. Elektronendichte Strukturen, peripherwärts angehäuft, formen einen dünnen Rand entlang der inneren Membran der Kernhülle. Unterschiedlich leuchtende Felder sind also charakteristisch für das Nukleoplasma. Ein wenig geformter Nukleus ist in vielen Zellen zu sehen. (Auszugsweise aus HAN<sup>29</sup> S. 183).

HAN hat durch eingehende elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellen des Lymphknotens der Ratte die möglichen Entwicklungsreihen aufgezeigt (vgl. Fig. 1). Als zentrale, pluripotente Stammzelle sieht der Autor die "nicht differenzierte Retikulumzelle" an. Es ist derzeit wahrscheinlicher, dass die zentrale Stammform die lymphoide Retikulumzelle (ROHR<sup>66</sup>, STOECKENIUS<sup>73</sup>, WINTER<sup>88</sup>) bzw. die "kleine Rundzelle" ist, zumal die Regenerationsvorgänge strahlengeschädigter Zellen des Lymphknotens und der Milz sehr eindrucksvoll die Bedeutung gerade dieser Zelle bestätigen (STENDER<sup>72</sup>).

Obwohl das beigelegte Schema von HAN<sup>29</sup> (vgl. Fig. 1) noch viele Fragen offen lässt, worauf der Verfasser selbst hinweist, kann es doch zur einprägsamen Orientierung recht wertvoll sein.

## B. Die Lymphozyten

Von der fixen und freien Retikulumzelle leiten BERNHARD und GRANBOULAN<sup>7</sup> die lymphatische Reihe ab.

Die Übergangsform zwischen Retikulumzelle und Lymphoblast wird charakterisiert durch eine runde bis ovale Zelle, die aber von geringerer Grösse als die Retikulumzelle ist. Der grosse Kern hat ein feinstrukturiertes Karyoplasma und einen gut abgrenzbaren Nukleolus, er entspricht damit weitgehend dem Kern der Retikulumzelle. Das Zytoplasma ist strukturarm, das Ergastoplasma ist kaum ausgeprägt. Die Ribosomen sind nicht sehr zahlreich. Die Mitochondrien erscheinen häufig geschwollen, ihre Matrix ist jedoch optisch dichter als bei Retikulumzellen.

### Der Lymphoblast

Die Lymphoblasten entsprechen nach BERNHARD und GRANBOULAN<sup>7</sup> den unter den Bezeichnungen "Prolymphozyten" (FERRA), "Grosse Lymphozyten" (Polyblasten MAXIMOW<sup>51</sup>) oder auch "Lymphogonia" (AMANO) bekannten Zellen. Der Lymphoblast ist gekennzeichnet als sehr junge Zelle, in welcher schon die ersten Charakteristika der Lymphozytendifferenzierung beobachtet werden können. Er ist nur in lymphopoetischen Geweben zu finden.

Der Kern ist oval, seine Oberfläche im allgemeinen glatt. Gelegentlich werden tiefere Einstülpungen der Kernmembran beobachtet. Das Chromatin ist gleichmässig verteilt und dichter als in den Retikulumzellen. Der Nukleolus, einfach oder doppelt vorhanden, kann sehr gross sein. Das Zytoplasma hat geringe Elektronendichte. Die Mitochondrien sind zahlreich und gross. Sie sind entweder gleichmässig um den Kern verteilt oder gehäuft an leichten Eindellungen des Kerns zu finden. Neben den charakteristisch grossen Mitochondrien sind dichte Körper mit einfacher Membran (Microbodies) vorhanden. Ein Ergastoplasma fehlt. Freie Ribosomen, zerstreut oder in unregelmässigen Komplexen, sind in grosser Zahl zu finden. Der Golgiapparat ist oft zu sehen, aber er umfasst nur wenige, nicht granulierte Bläschen oder sehr selten parallele Lamellen. (Auszugsweise aus BERNHARD und GRANBOULAN<sup>7</sup>.)

Die Darstellung des Lymphoblasten im Schema von HAN<sup>29</sup> (vgl. Fig. 1) entspricht im wesentlichen der von BERNHARD und GRANBOULAN<sup>7</sup> gegebenen Beschreibung.

#### Der kleine Lymphozyt

Der Kern ist rund, zeigt aber oft ein oder zwei schmale, tiefe Invaginationen des Zytoplasmas, manchmal mit einem Mitochondrium. Das Chromatin wird mit zunehmender Reifung dichter und homogener. Ein Nukleolus von geringer Grösse ist häufig vorhanden. Der Zytoplasmaanteil ist gegenüber dem Lymphoblasten deutlich reduziert, die Kern-Zytoplasmarelation wird zugunsten des Kernes verändert. Bei zunehmender optischer Dichte des Grundplasmas wird die Zelle schrittweise ärmer an Organellen. Die Mitochondrien sind weniger zahlreich; meist sind sie an einem Pol der Zelle versammelt. Ein endoplasmatisches Retikulum ist praktisch nicht vorhanden, lediglich einige mit Ribosomen besetzte kleine Bläschen sind nachweisbar. Im übrigen liegen die Ribosomen frei verteilt im Zytoplasma, wobei sie in Rosetten-spiralen angeordnet sein können. Der Golgiapparat ist vollständig verschwunden. Gelegentlich wurden Reste in Form von Vakuolen gefunden.

Zellen vom Erscheinungsbild der kleinen Lymphozyten stellen nicht immer die Endstufe einer Entwicklung dar. Unter besonderen Bedingungen können sie aktiviert werden und Stammzellenfunktionen annehmen (MILLER, OSABA<sup>52</sup>).

#### C. Die Plasmazellen

Seit der Beschreibung der Feinstruktur der Plasmazellen durch BRAUNSTEINER, FELLINDER, PAKESCH 1953<sup>11,12</sup> haben zahlreiche Autoren Beiträge zur Kenntnis dieser immunbiologisch so wichtigen Zellen beigetragen. Ohne auf die noch nicht abgeschlossene Diskussion über die Herkunft dieser Zellen einzugehen (EHRlich<sup>19</sup>, THIERY<sup>79,80,81</sup>, NEIL, FERNANDO und MOVAT<sup>58</sup>) sind zumindest drei Stadien in der Reifung der Plasmazellen gesichert:

1. Der Plasmoblast verfügt über einen grossen, rundlichen bis ovalen Kern. Die Nukleolen sind pleomorph und gross.

Die reichlich vorhandenen, freien Ribosomen sind oft in Komplexen angeordnet, Vesikel des endoplasmatischen Retikulums mit Ribosomenbesatz sind zuerst spärlich, später zahlreicher vorhanden.

2. Beim Proplasmozyt ist der Kern exzentrisch gelagert. Verglichen mit dem Plasmoblasten ist der Kern kleiner und die Kern-Zytoplasmarelation zugunsten des Zytoplasmas vergrössert. Die Nukleolen sind nicht so ausgeprägt und kleiner. Das Ergastoplasma ist gut entwickelt, und die meist erweiterten Zisternen des mit Ribosomen besetzten endoplasmatischen Retikulums erstrecken sich bis zum Zellrand. Nach BERNHARD und GRANBOULAN<sup>7</sup> enthalten die Ergastoplasamakanäle eine wolkgig aussehende Substanz. Auf der dem Zellinnern zugewandten Seite des Zellkernes finden sich regelmässig ein gut ausgebildeter Golgiapparat und gelegentlich Anschnitte von Zentriolen.

3. Im Plasmozyten, dem noch älteren Zellstadium, sind die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums noch stärker erweitert als bei Proplasmozyten. Der Golgiapparat im zentralen Bereich der Zelle nimmt noch grösseren Raum ein und verdrängt den Kern an die äusserste Zellperipherie. In noch späteren Zellstadien kommt es zu einem Schwund zytoplasmatischer Strukturen und zur Ausbildung Russel'scher Körper.

## Methode

### A Fixierungen

a) Die Formolfixierung (MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup>)

Rattenlymphknoten wurden in toto lebendfrisch in 10 %igem gepufferten Formol (Michaelispuffer pH = 6,9 - 7,3) bei 4°C 3 bis 3½ Stunden fixiert. Anschliessend wurde ebenfalls bei 4°C das Gewebe mit Michaelispuffer gewaschen und für je 15 Minuten in 50 %iges und 75 %iges Aceton überführt. Nach Erwärmen auf Zimmertemperatur wurden die Lymphknoten auf Blöcke von 1 mm Kantenlänge zugeschnitten. Die weitere Entwässerung erfolgte mit 90 %igem Aceton für 15 Minuten und wasserfreiem Aceton in dreimaligem Wechsel von je 10 Minuten.

b) Die Formol-Uranylacetatfixierung (MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup>)

Im Anschluss an die oben beschriebene Formolfixierung wurde mit einer 0,5 %igen wässrigen Uranylacetatlösung bei 4°C nachfixiert. Die Auswaschung erfolgte mit Michaelispuffer bei 4°C, dehydriert wurde in der aufsteigenden Acetonreihe in der oben beschriebenen Weise.

c) Die Formol-Osmiumfixierung (MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup>)

Im Anschluss an die oben beschriebene Formolfixierung wurde 1 Stunde mit 1 %iger gepufferter Osmiumtetroxidlösung (Michaelispuffer pH = 7,2) bei 4°C nachfixiert. Auswaschen und Entwässerung erfolgte in der beschriebenen Weise.

d) Die Glutaraldehydfixierung (SABATINI, BENSCH, BARNETT<sup>5,67,68</sup>; SABATINI, MILLER, BARNETT<sup>69</sup>)

Rattenlymphknoten wurden lebendfrisch in 6,5 %igem gepufferten Glutaraldehyd 3½ Stunden fixiert (Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH = 7,2 bei 4°C). In dem gleichen Puffer wurde ausgewaschen und in der aufsteigenden Acetonreihe dehydriert.

e) Die Osmiumfixierung nach PALADE<sup>60</sup>

Rattenlymphknoten wurden lebenfrisch in 1 %igem gepufferten Osmiumtetroxid fixiert (Michaelispuffer

pH = 7,2 bei 4°C). Ausgewaschen wurde im gleichen Puffer, entwässert in der aufsteigenden Acetonreihe.

## B Einbettung und Schnittechnik

Alle Präparate wurden in der üblichen Weise in Vestopal W eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C für 48 bis 60 Stunden.

Die Dünnschnitte wurden mit dem PORTER-BLUM-Mikrotom unter Verwendung von Glasmessern hergestellt und auf mit Movital befilmte Kupfernetze gebracht.

## C Die Kontrastierung der Dünnschnitte

Zur Kontrastierung wurden die auf den Kupfernetzen befindlichen Dünnschnitte auf die Oberfläche der jeweiligen Kontrastierungslösung gebracht. Nach der Kontrastierung wurden die Präparate mehrmals in Aqua dest. gespült.

### a) Die Bleiacetatkontrastierung

8,25 g Bleiacetat wurden in 15 ml CO<sub>2</sub>-freiem Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde anschliessend mit 25 %igem NH<sub>4</sub>OH auf pH = 7,2 (Glaselektrode) eingestellt. Kontrastierungsdauer: 10 Minuten.

### b) Die Uranylacetatkontrastierung

Die Kontrastierungslösung bestand aus einer gesättigten (ungefähr 5 %igen) wässrigen Uranylacetatlösung. Kontrastierungsdauer: 20 Minuten.

### c) Die Kontrastierung mit alkalischen Bleilösungen

Zur Kontrastierung mit Bleihydroxidlösungen bei hohem pH-Wert wurde die Methode von KARNOVSKY<sup>40</sup> verwendet. Zur Herstellung der Pb(OH)<sub>4</sub>-Stammlösung wurden 2,01 g NaOH mit frisch abgekochtem Aqua dest. abgespült und in 50 ml Aqua dest. gelöst. PbO wird im Überschuss (2 Spatelspitzen) zugegeben und 15 Minuten auf kleiner Flamme gekocht (die letzten 5 Minuten ohne Deckel), danach schnell abgekühlt und filtriert. Diese Stammlösung wird im Verhältnis 1:100 mit frisch abgekochtem und abgekühltem Aqua dest. verdünnt und 15 Minuten zentrifugiert. (2000 Umdrehungen pro Minute.) Kontrastierungsdauer: 5 Minuten.

d) Die Osmiumkontrastierung

Als Kontrastierungslösung diente eine 1 %ige Osmium-tetroxidlösung (Michaelispuffer pH = 7,2).

Kontrastierungsdauer: 1 Stunde.

e) Die Kaliumpermanganatkontrastierung

Die Kontrastierungslösung bestand aus einer wässrigen 1,2 %igen  $\text{KMnO}_4$ -Lösung. Kontrastierungsdauer: 10 Minuten.

Anschliessend wurde zweimal mit  $\text{CO}_2$ -freiem Aqua dest. und zweimal mit verdünnter Zitronensäure (50 %ige Lösung auf 1/50 verdünnt) gespült.

f) Die Osmium-Bleikontrastierung

Nach der Osmiumkontrastierung nach d) wurden die Schnitte gewaschen und anschliessend mit der Bleikontrastierung nach KARNOVSKY<sup>40</sup> (vgl. c) nachkontrastiert.

g) Die Uranylacetat-Bleihydroxidkontrastierung

Die Dünnschnitte wurden wie bei der einfachen Uranylacetatkontrastierung nach b) behandelt und anschliessend der Bleikontrastierung nach KARNOVSKY<sup>40</sup> unterworfen.

D Elektronenmikroskopischer Untersuchungsgang

Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem Siemens-Elektronenmikroskop Elmiskop I.

K Die Behandlung der lichtmikroskopischen Präparate

Die in 10 %igem Formalin oder nach BOUIN fixierten Gewebsstücke wurden in Paraffin oder Paraffincelloidin eingebettet. Etwa 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte wurden angefertigt. Zur Färbung wurde Hämalaun und Giemsa-Färbung in Kombination zur Anwendung gebracht. Im einzelnen wurde folgender Vorgang eingehalten: dreimal Xylol 12 Minuten, zweimal absoluter Alkohol 5 Minuten, je zwei Minuten Alkohol 96 % und 70 %. Zwei Minuten spülen in Aqua dest., Kernfärbung mit Hämalaun MAYER in progressiver Färbung mit Zwischenspülung in Leitungswasser und Kontrolle unter dem Mikroskop (6 Minuten). Waschen in fliessendem Leitungswasser 10 bis 12 Minuten, Differenzierung in Salzsäurealkohol. Nach

Übertragung in Aqua dest. (pH = 7) Giemsaefärbung  
18 Minuten, Spülen in gepuffertem Aqua dest., Entwässerung  
in der Alkoholreihe 2 Minuten 70 %ig, 1 Minute 96 %ig,  
zweimal absoluter Alkohol je 1 Minute. Anschliessend  
dreimal Xylol je 10 bis 13 Minuten. Einschlussmittel  
Caedax.

## Ergebnisse

### I. Die Formolfixierung

Wie MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> 1962 schon feststellten, gestattet die Formolfixierung nicht, die Zytomembranen zufriedenstellend elektronenmikroskopisch darzustellen. Der osmiophile Charakter der Membranstrukturen der Zelle bestätigt sich. Auch die Nachkontrastierung von Schnitten formolfixierter Gewebe mit Bleiacetat, Bleihydroxid, Osmiumtetroxid und Uranylacetat kann diesen Mangel nicht restlos beheben. Mit Osmiumtetroxid, Bleihydroxid oder vor allem mit Bleiacetat nachkontrastierte Schnitte formolfixierten Materials entsprechen zwar annähernd dem Bild der osmiumtetroxidfixierten Zelle. Dieser Eindruck wird aber vermutlich durch die starke Kontrastierung der Ribosomen hervorgerufen. Die Formolfixierung ist daher für spezielle Studien der Membranstrukturen und Organellen der Zelle, d.h. zur Darstellung des endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates, der Mitochondrien und der Zellhüllen, wenig geeignet. Die Kontinuität der Zellverbände erscheint unterbrochen, so dass jede Zelle isoliert erscheint. Trotz dieser Beschränkungen erlaubt diese Fixierung eine Identifizierung der Zellart. Ihr Hauptvorteil liegt jedoch darin, dass eine Kontrastierung von Gewebsbestandteilen bei der Fixierung nicht erfolgt, so dass eine differenzierte Nachkontrastierung stofflich verschiedener Strukturelemente möglich ist. Wie im Folgenden gezeigt wird, erstreckt sich das vor allem auf eine Differenzierung der intranukleären Nukleinsäuren.

### Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleiacetat nach Formolfixierung (Abgekürzt: Formol//Bleiacetat) (vgl. Fig. 3).

Retikulumzellen, die Zellen der lymphozytären Reihe und Plasmazellen sind gut erkennbar. Die membranösen Strukturen bekommen keinen stärkeren elektronenmikroskopischen Kontrast. Durch die kontrastreiche Darstellung der Ribosomen tritt die Ergastoplasmastruktur deutlich hervor, die perlenkettenartige Anordnung der Ribosomen kann durchgehende

Ergastoplaslamamellen vortäuschen. Das Golgifeld ist nur in seiner Ausdehnung erkennbar, es zeigt keine Strukturen (vgl. Fig. 4). Auch die Mitochondrien sind nicht darstellbar.

Der Aspekt des Kernes erscheint bei dieser Technik in besonderer Weise. Die Kerngrenze ist deutlich sichtbar, das Chromatin aber, das bei den gebräuchlichsten Methoden sehr elektronendicht ist, erscheint bei den formolfixierten und bleiacetatkontrastierten Schnitten "ungefärbt". Die "substance interchromatienne" (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) zeigt dagegen deutlichen Kontrast. Mit anderen Techniken wurde bei unserer Untersuchung kein derartiger Effekt erzielt.

Die unregelmässige Verteilung des kontrastierten Materials im Nukleus sowie das bei einigen Schnitten noch zum Teil sichtbare Chromatin könnten den Schluss rechtfertigen, dass es sich um eine Chromatinextraktion handelt. Niemals erschien jedoch nach unseren Erfahrungen der Nukleus leer. Die interchromatische Substanz bleibt immer angedeutet.

Erwähnenswert erscheint uns der Hinweis, dass trotz scheinbaren, fast vollständigen Fehlens des Chromatins die innere Kernhülle durch einen schmalen Saum randständigen Chromatins immer dargestellt bleibt. Ausserdem erscheint bei dieser Technik innerhalb der perinukleären Zisterne eine kontrastierte, lineare Struktur, die besonders bei der Glutaraldehydfixierung deutlich hervortritt.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxid nach Formolfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) (abgekürzt: Formol//Bleihydroxid) (vgl. Fig. 5).

Die Autoren MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> fanden bei Anwendung dieser Technik, dass die elektronenoptische Dichte des Nukleolus und der Ribosomen, d.h. der vorwiegend RNS-haltigen Strukturen deutlich verstärkt ist, wogegen sich das DNS-haltige Chromatin nicht abhebt. Sie vermuten eine mögliche Extraktion des Chromatins bei dieser Technik.

Bei unseren Untersuchungen haben sich diese Ergebnisse bestätigt. Vor allem bei Lymphozyten, deren Chromatinverteilung im Nukleus bei den verschiedenen Techniken recht gleichartig dargestellt wird, ergibt sich bei der Behandlung Formol//Bleihydroxid ein fehlerhaftes Bild. Der Nukleolus

kann jedoch bei dieser Technik sehr plastisch in Erscheinung treten.

Das Zytoplasma ist mässig differenziert, die Zellstrukturen sind nur angedeutet.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat nach Formolfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) (abgekürzt: Formol//Uranyl) (vgl. Fig. 6).

Wie auch MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> fanden, kommt es bei dieser Technik zu einer differenzierten Darstellung der Nukleinsäuren. Zwar wird der Kontrast aller nukleinsäurehaltigen Strukturen erhöht, das DNS-haltige Chromatin erscheint jedoch deutlich stärker kontrastiert und hebt sich dadurch von der interchromatischen Substanz ab. Auch die intranukleären Kanäle sind gut sichtbar. Der Nukleolus wird mit geringerem Kontrast als das Chromatin dargestellt und ist deshalb einwandfrei erkennbar (vgl. Fig. 6a). Eine so hervorragende Differenzierung des Nukleolus, wie sie MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> bei Pankreaszellen erhielten, konnte bei unserem Material jedoch nicht erzielt werden.

Die Ribosomen sind deutlich dargestellt aber nicht speziell unterschieden von den intranukleären Nukleoproteiden. Der Zelltyp ist bei dieser Technik nicht immer gut erkennbar, da die übrigen zytoplasmatischen Strukturen der Zelle nur unbefriedigend zur Darstellung kommen.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Osmiumtetroxid nach Formolfixierung (abgekürzt: Formol//Osmium) (vgl. Fig. 7).

Die hier versuchte Technik unterscheidet sich im Ergebnis kaum von der reinen Formolfixierung ohne Kontrastierung. Das allgemeine Bild der Zelle, wie auch die morphologischen Einzelheiten gleichen den Bildern, die MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup> mit der Formolfixierung allein erhalten haben.

Die mässige Kerndifferenzierung, die Nichtdarstellung der Mitochondrien und des Golgifeldes sowie das Fehlen der Zytomembranen werden durch die recht gute Darstellung der Ribosomen, die wenigstens bei Plasmazellen reichlich vorhanden sind, nicht aufgewogen. Die Zellart ist hierdurch aber

gut erkennbar. Im Gegensatz zu den RNS-haltigen Ribosomen wird der RNS-haltige Nukleolus nicht dargestellt.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat, gefolgt von Bleihydroxid nach Formolfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) (abgekürzt: Formol//Uranyl, Bleihydroxid) (vgl. Fig. 8).

In Übereinstimmung mit den Befunden von MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup> erscheint das Chromatin bei dieser Technik tief-schwarz "gefärbt", die interchromatische Substanz kontrast-ärmer, aber ausgezeichnet dargestellt. Der granulierte Nukleolus ist sehr gut differenziert, er erscheint etwas heller als das ihn umgebende Chromatin. Die Ribosomen zeigen schwächeren Kontrast als das Chromatin; sie sind gut erkennbar.

Erwähnenswert ist, dass bei dieser Technik das Golgi-feld zwar keine lamelläre Struktur zeigt, die Golgivakuolen und ihr Material aber sehr gut in Erscheinung treten. Die Lymphozyten sind leicht identifizierbar; die Zytomembranen fehlen, die pseudopodienartigen Fortsätze geben ein "lebendes" Bild von der Beweglichkeit dieser Zellart. Die Mitochondrien sind erkennbar.

Besonders geeignet ist diese Technik für das Studium phagozytischer Zellen. Bei keiner anderen Methode wurde ein so grosser Reichtum von Einschlussmaterial im Zytoplasma beobachtet. Auch das Kollagen ist gut kontrastiert, Einzelheiten sind erkennbar. Die Granula in den eosinophilen Granulozyten erscheinen noch kontrastreicher als bei der Osmium//Bleihydroxidtechnik.

Die Methode der Formolfixierung verbunden mit der Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleihydroxid verdient, mehr als bisher beachtet zu werden. Sie kann zu den besten Techniken für Kernstudien gerechnet werden.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Osmiumtetroxid, gefolgt von Bleihydroxid nach Formolfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) (abgekürzt: Formol//Osmium, Bleihydroxid) (vgl. Fig. 9).

Unsere Untersuchungen haben die Ergebnisse von MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> in jedem Punkt bestätigt. Die Farbtintensität

des Chromatins ist schwach, aber doch wesentlich klarer als bei der einfachen Nachkontrastierung mit Bleihydroxid nach Formolfixierung. Die Nukleolen und die Ribosomen erscheinen sehr elektronendicht, aber strukturell verschieden von den in der interchromatischen Substanz verteilten Granula. Für detaillierte Untersuchungen des Nukleolus erscheint diese Technik Erfolg zu versprechen.

Sehr eigenartig stellt sich bei dieser Methode das Golgifeld der Plasmazellen dar (vgl. Fig. 10). Trotz Fehlens der lamellären Strukturen hebt es sich sehr deutlich in der Kernnachbarschaft ab (vgl. Fig. 11). Bei anderen Kontrastierungen formolfixierter Schnitte war dieser Effekt nicht zu erreichen.

## II. Die Doppelfixierung Formol-Uranylacetat nach MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup>

Diese Fixierungsart wird von MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> kritisiert, da sie keine zufriedenstellende Konservierung der Gewebe gestattet. In bezug auf die Möglichkeit einer selektiven Kontrastierung der nukleinsäurehaltigen Strukturen ist sie dagegen der reinen Formolfixierung überlegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik angewandt und zu den von MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> angegebenen Kontrastmitteln Uranylacetat und Bleihydroxid zusätzlich auch Bleiacetat verwendet.

### Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleiacetat nach Formol-Uranylacetatfixierung (abgekürzt: Formol-Uranyl//Bleiacetat) (vgl. Fig. 12).

Die Ergebnisse dieser Methode erscheinen auf den ersten Blick unbefriedigend. Fast alle membranösen Strukturen fehlen. Im Zytoplasma geben nur die gut kontrastierten Ribosomen den Verlauf des Ergastoplasmas an. Der Kern selbst ist überaus schwach kontrastiert, so dass nur seine Umrisse, diese aber deutlich, zu erkennen sind. Der innere Kernrand ist auch bei dieser Technik durch einen schmalen Chromatinsaum zu erkennen.

Bei genauer Betrachtung sieht man im Kern sehr deutlich Zytoplasmataschen, die durch den starken Kontrast der darin befindlichen Ribosomen ins Auge fallen (vgl. Fig. 12). Meist ist ein Ergastoplasmastiel zu erkennen, manchmal sind nur ringförmige Anschnitte der Invaginationen abgebildet.

Der Nukleolus kann in einzelnen Bildern gerade noch erkannt werden. Er enthält bei dieser Technik kein elektrodichtes Material, obwohl die Ribonukleoproteidgranula des Zytoplasmas gut kontrastiert sind.

Nach unserer Erfahrung kann diese Technik zum Nachweis zytoplasmatischer Invaginationen in den Kern, und damit zur Identifizierung sogenannter Kerneinschlüsse, empfohlen werden.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxid nach Formol-Uranylacetatfixierung nach MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup> (abgekürzt: Formol-Uranyl//Bleihydroxid) (vgl. Fig. 13).

Unsere Ergebnisse zeigen keine Abweichungen von den Resultaten der Autoren<sup>49</sup>. Das Chromatin ist sehr gut und stärker kontrastiert als der Nukleolus und die Ribosomen; die Nukleoproteide sind damit gut von einander zu unterscheiden. Der locker granulierte Nukleolus hebt sich deutlich vom dunklen Chromatin ab, ebenso von der flockigen interchromatischen Substanz (vgl. Fig. 31 II/o). Diese erstreckt sich kanalartig bis zum Rand des Nukleus, das Chromatin durchziehend. Die gut kontrastierten Ribosomen lassen den lamellären Aufbau des Ergastoplasmas deutlich erkennen.

Diese Technik eignet sich hervorragend für die spezielle Untersuchung der Struktur des Karyoplasmas. Die Darstellung der zytoplasmatischen Struktur ist dagegen wenig befriedigend.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat nach Formol-Uranylacetatfixierung nach MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup> (abgekürzt: Formol-Uranyl//Uranyl) (vgl. Fig. 14).

Die Ergebnisse dieser Technik sind ähnlich denen, die man bei der Formol-Uranyl//Bleihydroxid-Methode erhält, doch sind hier die Kontraste im allgemeinen wesentlich geringer.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Kaliumpermanganat nach Formol-Uranylacetatfixierung (abgekürzt: Formol-Uranyl//KMnO<sub>4</sub>) (vgl. Fig. 15).

Die Ergebnisse befriedigen nur selten. Eine Hauptschwierigkeit der Methode liegt im Auftreten von Niederschlägen. Bei gelungener Kontrastierung stellen sich die Zytomembranen nicht dar, das Ergastoplasma erscheint homogen granuliert. Das Golgifeld und die Mitochondrien kommen nicht zur Darstellung. Die Kernbegrenzung ist erkennbar. Das Chromatin ist gering, jedoch stärker als die interchromatische Substanz kontrastiert. Der Nukleolus und die Ribosomen sind erkennbar als stärker als das Chromatin kontrastierter Bezirk. Die Unterscheidung der Zellarten ist schwierig. Am stärksten ist der Kontrast der Ribosomen und des Nukleolus, der sich damit vom umgebenden Chromatin abhebt.

III. Die Formol-Osmiumtetroxidfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>)

Auf Grund der Befunde, die MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> mit dieser Technik erzielten, ist eine gute Darstellung der Ultrastruktur des Kerns zu erwarten. In der Kombination mit Kontrastmitteln wie Uranylacetat oder Bleihydroxid liefert diese Fixierung einwandfreie und reproduzierbare Darstellungen.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxid nach Formol-Osmiumtetroxidfixierung (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>) (abgekürzt: Formol-Osmium//Bleihydroxid) (vgl. Fig. 16).

Bei dieser Technik war die Intensität in der Darstellung des Chromatins, der Nukleolen und der Ribosomen nicht so stark, wie man auf Grund der zur Kontrastierung benutzten Schwermetalle Osmium und Blei erwarten sollte (vgl. auch MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>). Die Bestandteile des Kerns sind jedoch deutlich zu erkennen, wobei der Nukleolus weniger durch stärkeren Kontrast als durch die dichtere Art der Granulierung dargestellt ist. Es lassen sich mit dieser Technik recht eindrucksvolle Bilder der Nukleolen erzielen.

#### IV. Die Osmiumtetroxidfixierung (PALADE<sup>60</sup>)

Diese Fixation nach PALADE<sup>60</sup> sowie ihre Modifikation nach SJÖSTRAND oder MILLONING<sup>53,54</sup> gehören auch heute noch zu den am meisten verwendeten Techniken in der Elektronenmikroskopie. Die vollkommene Darstellung aller morphologischen Einzelheiten der Zellen rechtfertigen den Gebrauch.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den gebräuchlichen Kontrastmitteln Bleihydroxid und Uranylacetat ausserdem Bleiacetat und die Doppelkontrastierung Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid zur Anwendung gebracht.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleiacetat nach Osmiumtetroxidfixierung (abgekürzt: Osmium//Bleiacetat) (vgl. Fig. 17).

Diese Technik steht der Osmium//Bleihydroxidtechnik nicht nach. Man erhält eine ausgezeichnete Darstellung aller zellulären Strukturen. Die Zellgrenzen sind scharf kontrastiert, die Kernhüllen treten weniger in Erscheinung. Im Zellkern wird die Unterscheidung der Komponenten weniger durch verschiedenen Kontrast als durch Grösse und Verteilung der Granulation ermöglicht. Die Nukleolen sind gut erkennbar.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxid nach Osmiumtetroxidfixierung (abgekürzt: Osmium//Bleihydroxid) (vgl. Fig. 18).

Durch diese heute in der Praxis am meisten angewandte Technik ist es nicht möglich, eine Differenzierung der Nukleoproteide durch Kontrastunterschiede zu erreichen. Die intensiv kontrastierten granulären Bestandteile des Kernes variieren in Grösse und räumlicher Dichte. Der Nukleolus setzt sich aus grossen und kleinen Körnchen zusammen. Die interchromatische Substanz erscheint flockig, Kernkanäle kommen meist nicht deutlich zur Darstellung. Die Ribosomen sind gut erkennbar.

Für allgemeine morphologische Studien, bei denen die kontrastreiche Darstellung aller Gewebskomponenten im Vordergrund steht, ist diese Technik wohl allen anderen Methoden überlegen.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat nach Osmiumtetroxidfixierung (abgekürzt: Osmium//Uranyl) (vgl. Fig. 19).

Bei der Uranylacetatkontrastierung sind nach unseren Erfahrungen in Kernen, zumindest von Lymphozyten, Granula sehr unterschiedlichen Kontrastes zu beobachten. Die interchromatische Substanz setzt sich deutlich ab, ebenso werden intranukleäre Kanäle zur Kernperipherie sichtbar. Im übrigen liefert diese Technik ähnliche Resultate wie die Osmium//Bleihydroxidtechnik.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat, gefolgt von Bleihydroxid nach Osmiumtetroxidfixierung (abgekürzt: Osmium//Uranyl-Bleihydroxid) (vgl. Fig. 20).

Diese Technik vereinigt nach unserer Meinung in günstiger Weise die Bleihydroxid- und die Uranylacetatkontrastierung. Die recht gute Darstellung aller membranösen Strukturen einschliesslich der Mitochondrien sowie der Kerne ist offensichtlich. Die drei Komponenten der Kerne sind erkennbar, das Chromatin erscheint grob und dunkel granuliert, die interchromatische Substanz elektronendurchlässiger, auch bezüglich der einzelnen Granula. Intranukleäre Kanäle sind sichtbar. Sehr deutlich hebt sich der Nukleolus durch seine feine Granulation ab, wobei Komplexbildungen der Granula beobachtet werden.

Diese Technik scheint der Osmium//Bleihydroxidmethode gleichwertig zu sein, wenn auch die etwas weniger scharfe Kontrastierung des Golgifeldes und der Mitochondrien in Kauf genommen werden muss. Sie bietet jedoch den Vorteil der einwandfreien Unterscheidung der strukturellen Kernkomponenten.

## V. Die Glutaraldehydfixierung

SABATINI<sup>5,68,69</sup>, BENSCH<sup>5,67,68</sup>, BARNETT<sup>5,67,68,69</sup> und MILLER<sup>69</sup> zeigten, dass bei der Glutaraldehydfixierung die zelluläre Feinstruktur in hervorragender Weise erhalten bleibt. Diese Fixierung soll nach Meinung der genannten Autoren der Formolfixierung überlegen sein, weil im allgemeinen keine Gewebsverquellungen und Zerreissungen eintreten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Glutaraldehyd fixierten Gewebe nach der von MILLER, SABATINI und BARNETT<sup>69</sup> angegebenen Technik mit Uranylacetat und Bleihydroxid kontrastiert, ausserdem wurde noch zusätzlich Bleiacetat verwendet.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleiacetat nach Glutaraldehydfixierung (abgekürzt: Glutaraldehyd//Bleiacetat) (vgl. Fig. 21).

Bei dieser Technik werden keine grossen Kontrastunterschiede beobachtet. Der Aspekt der Kernkomponenten ist indifferent, die anscheinende Differenzierung der einzelnen Strukturelemente ist lediglich durch die unterschiedliche Lagerungsdichte der einzelnen Granula begründet. Das Chromatin zeigt sich nicht wie bei osmiumfixierten Zellen locker granuliert, es macht vielmehr einen kompakten Eindruck, besonders an der Kernperipherie. An einigen Stellen wird es durch helle Kanäle unterbrochen. Das peripherwärts gelegene Chromatin bildet einen dünnen, gut kontrastierten Randsaum, der durch Poren unterbrochen wird.

Im perinukleären Spalt, zwischen den beiden hier nicht zur Darstellung kommenden Kernmembranen, erscheint bei dieser Fixierung eine gut kontrastierte membranähnliche Schicht (vgl. Fig. 22), wie sie bei der Glutaraldehyd//Bleihydroxidechnik beschrieben wird und von uns auch bei der Formol//Bleiacetatechnik gefunden wurde (siehe Seite 23).

Die flockige, interchromatische Substanz ist elektronendurchlässiger als das Chromatin. Vereinzelt sind verschieden grosse gut kontrastierte Granula in der interchromatischen Substanz verteilt zu beobachten.

Ein Nukleolus lässt sich mit dieser Technik nicht einwandfrei darstellen. Die Ribosomen erscheinen elektronendichter als das Chromatin. Membranen werden bei dieser Technik schlecht dargestellt, Mitochondrien sind daher nicht zu erkennen.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Bleihydroxid nach Glutaraldehydfixierung (abgekürzt: Glutaraldehyd//Blei-hydroxid) (vgl. Fig. 23).

Die Ergebnisse, die wir mit dieser Technik erhielten, stimmen mit den von SABATINI, MILLER, BARNETT<sup>69</sup> angegebenen Resultaten überein. Durch die Bleihydroxidbehandlung der Dünnschnitte wird eine wesentliche Kontrastierung aller Kernkomponenten erreicht. Besonders grosse Intensität zeigen auch die Ribosomen, so dass die lamelläre Anordnung des Ergastoplasmas in Erscheinung tritt, obwohl die endoplasmatischen Membranen nicht zur Darstellung kommen. Alle Zellstrukturen treten hier bedeutend klarer als bei der Glutaraldehyd//Bleiacetatechnik hervor. Die das Chromatin durchziehenden Kanäle der interchromatischen Substanz sind hier wesentlich eindrucksvoller dargestellt. Kernporen sind ebenfalls auch zu beobachten.

Erwähnenswert scheint zu sein, dass man im perinukleären Spalt und in den von Ribosomen begrenzten Zisternen des endoplasmatischen Retikulums eine lamelläre Struktur sieht, die aus einer Kette kleiner Granula, die wesentlich kleiner als die Ribosomen sind, zusammengesetzt ist (vgl. Fig. 23). An einigen Stellen ist diese Struktur durchgehend, manchmal porenartig oder durch grössere Lücken unterbrochen.

Membranen werden im allgemeinen bei dieser Technik nicht dargestellt. Die Mitochondrien sind verwaschen zu erkennen. Mit dieser Technik ist es nicht leicht, die Zellarten zu identifizieren.

Die Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat nach Glutaraldehydfixierung (abgekürzt: Glutaraldehyd//Uranyl) (vgl. Fig. 24).

Entsprechend seiner bekannten Spezifität für Nukleinsäuren [2,5,69] steigert Uranylacetat den Kontrast der Nukleoproteide, so dass die Kernstruktur deutlich hervortritt. Das Chromatin erscheint homogen und ist sehr elektronendicht. Intranukleäre Kanäle sind dargestellt. Das peripherwärts gelegene Chromatin bildet auch bei dieser Technik einen klar erkennbaren Randsaum.

Der Nukleolus ist etwas schwächer als das Chromatin kontrastiert; er erscheint im Aufbau kompakt, eine besondere Granulierung ist höchstens schwach angedeutet. Die interchromatische Substanz ist flockig, oft sind gut kontrastierte Granula in ihr regellos verteilt. Die Ribosomen sind mässig gut dargestellt.

Der perinukleäre Spalt zeigt auch bei dieser Technik, wenn auch in geringerem Masse, die oben beschriebene Verdichtung. Membranen kommen nicht zur Darstellung.

### Diskussion

Nach den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen ist es möglich, durch geeignete Fixierung und Kontrastierung unterschiedliche Kontrastintensitäten der Nukleoproteide zu erhalten. Die Grundlage für diese Erkenntnisse legten die systematischen Untersuchungen von MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup>.

In der vorliegenden Untersuchung kamen zusätzlich Glutaraldehyd als Fixierungsmittel (SABATINI, BENSCH, BARNETT<sup>5,67,68</sup>), (SABATINI, MILLER, BARNETT<sup>69</sup>) und ausser den üblichen Kontrastierungsmitteln noch Bleiacetat (DALTON, ZEIGEL<sup>18</sup>) sowie Kaliumpermanganat (LAWN<sup>42</sup>) zur Anwendung. Darüberhinaus untersuchten wir den Effekt, den Bleiacetat, und Uranylacetat, gefolgt von Bleihydroxid als Kontrastierungsmittel bewirken.

Die Beobachtungen aus den versuchten Techniken sind in der Tabelle zusammengefasst.

| Fixierung      | Nachkontra-<br>stierung   | Relativer Kontrast für: |                                         |                   |                |                      |
|----------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-------------------|----------------|----------------------|
|                |                           | Chro-<br>matin          | Inter-<br>chroma-<br>tische<br>Substanz | Nuk-<br>leolus    | Ribo-<br>somen | Membran-<br>systeme  |
| Formol         | Bleiacetat                | -                       | x                                       | -                 | xxx            | -                    |
| Formol         | Bleihydroxid              | x                       | x                                       | sehr<br>deutlich  | xxx            | -                    |
| Formol         | Uranyl                    | xxxx                    | xx                                      | deutlich          | xx             | -                    |
| Formol         | Osmium                    | xx                      | x                                       | -                 | xx             | -                    |
| Formol         | Uranyl, Blei-<br>hydroxid | xxxx                    | x                                       | sehr<br>deutlich  | xx             | -                    |
| Formol         | Osmium, Blei-<br>hydroxid | xx                      | x                                       | sehr<br>deutlich  | xxxx           | -                    |
| Formol, Uranyl | Bleiacetat                | -                       | -                                       | -                 | xx             | -                    |
| Formol, Uranyl | Bleihydroxid              | xxxx                    | xx                                      | sehr<br>deutlich  | xx             | -                    |
| Formol, Uranyl | Uranyl                    | xx                      | x                                       | ?                 | x              | -                    |
| Formol, Uranyl | KMnO <sub>4</sub>         | x                       | -                                       | deutlich          | xxx            | -                    |
| Formol, Osmium | Bleihydroxid              | x                       | x                                       | sehr<br>deutlich  | x              | deutlich             |
| Osmium         | Bleiacetat                | xx                      | x                                       | deutlich          | xx             | deutlich             |
| Osmium         | Bleihydroxid              | xxx                     | x                                       | sehr<br>deutlich  | xx             | sehr<br>deutlich     |
| Osmium         | Uranyl                    | xx                      | x                                       | wenig<br>deutlich | x              | sehr<br>deutlich     |
| Osmium         | Uranyl, Blei-<br>hydroxid | xxx                     | x                                       | sehr<br>deutlich  | xx             | sehr<br>deutlich     |
| Glutaraldehyd  | Bleiacetat                | x                       | x                                       | -                 | xxx            | sehr un-<br>deutlich |
| Glutaraldehyd  | Bleihydroxid              | xx                      | x                                       | deutlich          | xxxx           | sehr un-<br>deutlich |
| Glutaraldehyd  | Uranyl                    | xxxx                    | xx                                      | deutlich          | xx             | -                    |

Ohne auf die bisher noch nicht vollständig erklärbare Wirkungsweise der einzelnen Fixierungs- und Kontrastierungsmittel einzugehen, kann man sagen, dass einige Techniken in der Lage sind, die Darstellung des Kernchromatins fast ganz oder wenigstens weitgehend im elektronenmikroskopischen Bild zu unterdrücken. Im Bereich der untersuchten Fixierungs- und Kontrastierungsmittel sind dies folgende Kombinationen:

1. Formol //Bleiacetat (vgl. Fig. 3 und Fig. 4)
2. Formol //Bleihydroxid (vgl. Fig. 5)
3. Formol //Osmium, Bleihydroxid (vgl. Fig. 9 und Fig. 10)
4. Formol, Uranyl//Bleiacetat (vgl. Fig. 12)
5. Formol, Uranyl// $\text{KMnO}_4$  (vgl. Fig. 15)
6. Glutaraldehyd //Bleiacetat (vgl. Fig. 21)
7. Glutaraldehyd //Bleihydroxid (vgl. Fig. 23)

Im Gegensatz dazu erscheinen bei Anwendung dieser Techniken die RNS-haltigen Ribosomen so stark kontrastiert, dass sie im Plasma sofort ins Auge fallen. Selbst bei schwacher Mitkontrastierung des Chromatins ist der Kontrastunterschied so gross, dass man von einer selektiven "Färbung" der Ribosomen sprechen kann.

Es ist erwähnenswert, dass bei den oben genannten Kombinationen als erstes Fixierungsmittel nur Aldehyde vorkommen. Als Kontrastierungsmittel sind, ausgenommen bei der Formol, Uranyl// $\text{KMnO}_4$ -Technik, immer Bleiverbindungen angewandt, also Bleiacetat oder Bleihydroxid allein, sowie Bleihydroxid mit Osmiumtetroxid kombiniert.

Es bestätigt sich damit, dass Bleihydroxid vor allem die Ribosomen kontrastiert (MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>). Auch SABATINI, MILLER und BARNETT<sup>69</sup> stellten fest, dass Bleihydroxidkontrastierung auf glutaraldehydfixiertes Material angewendet das ribosomale Material im Zytoplasma und ebenso die Granula im Nukleolus intensiv kontrastiert.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass nach unserer Erfahrung auch das Bleiacetat ein ausgezeichnetes Mittel zur selektiven Kontrastierung der RNS-haltigen Struktur ist.

Eine zweite Gruppe von Kombinationen der gebräuchlichen Fixierungs- und Kontrastierungsmittel bezweckt, das Kern-

chromatin stark zu kontrastieren, damit die anderen, RNS-haltigen Strukturen durch relativen Kontrastunterschied sichtbar werden. Massgebend sind bei diesen Methoden weniger die ausschliessliche Kontrastierung einer Komponente als vielmehr der relative Kontrast zwischen zwei Strukturen. MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> haben die geeignetsten Techniken zusammengestellt und die vermuteten Grundlagen der verschiedenen Kontrastierungen dargelegt. Für die Glutaraldehydfixation und für andere Aldehyde studierten SABATINI, BENSCH, BARNETT<sup>5,67,68</sup> und SABATINI, MILLER, BARNETT<sup>69</sup> die Zusammenhänge.

In Übereinstimmung mit den genannten Autoren kommen nach unseren Untersuchungen für eine bevorzugte Kontrastierung des Kernchromatins folgende Techniken in Frage:

1. Formol //Uranyl (vgl. Fig. 6 und Fig. 6a)
2. Formol //Uranyl, Bleihydroxid (vgl. Fig. 8)
3. Formol, Uranyl//Bleihydroxid (vgl. Fig. 13)
4. Formol, Uranyl//Uranyl (vgl. Fig. 14)
5. Glutaraldehyd //Uranyl (vgl. Fig. 24)
6. Formol, Osmium//Uranyl (nach Angabe von  
MARINOZZI, GAUTIER<sup>49</sup>)

Auch bei dieser Gruppe ist die erste Fixierung der Präparate mit einem Aldehyd Voraussetzung für den gewünschten Erfolg. Osmiumtetroxid wirkt als zweites Fixierungsmittel nach MARINOZZI und GAUTIER<sup>49</sup> als "Stabilisator" für die Chromatinstruktur. Je nach der Stelle des Einsatzes der als Kontrastmittel betrachteten Stoffe, wie Uranylacetat und Bleihydroxid, ergeben sich dann die im einzelnen verschiedenen Kontrastdifferenzen.

Bei unseren Untersuchungen ergab sich, dass Unterschiede in den Komponenten des Nukleus auch erzielt werden konnten bei der Verwendung von Osmiumtetroxid als Fixierungsmittel in Verbindung mit einer Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid (vgl. Fig. 20). Wenn auch die Unterschiede im Kontrast und in der Art der Darstellung nicht so auffallend sind wie bei den oben angeführten Techniken, so ist doch infolge der unterschiedlichen Granulation des Chromatins und der Nukleolarsubstanz

eine Differenzierung möglich. Dieser Unterschied bezieht sich nicht wie bei den unten angeführten Methoden lediglich auf die Lagerungsdichte der gleichkontrastierten Granula, sondern vielmehr auf deren Grösse und auf ihren Kontrast.

Einen ähnlichen, aber nicht so deutlichen Effekt erhält man auch bei der Osmiumfixierung mit nachfolgender Uranylacetatkontrastierung (vgl. Fig. 19).

Die folgenden Kombinationen von Fixierungs- und Kontrastierungsmitteln sind zur elektronenmikroskopischen Unterscheidung der Nukleoproteide nicht geeignet, da sie alle Kernkomponenten mit praktisch identischem Kontrast zur Darstellung bringen. Unterschiede in den Strukturen entstehen bei diesen Techniken nur dadurch, dass die Verteilung der gleichkontrastierten Granula an verschiedenen Stellen verschieden dicht sein kann. Daher ist in bestimmten Fällen eine Differenzierung zwischen Nukleolus und Chromatin möglich. Zu diesen Techniken gehören:

1. Formol //Osmium (vgl. Fig. 7)
2. Formol, Osmium//Bleihydroxid (vgl. Fig. 16)
3. Osmium //Bleiacetat (vgl. Fig. 17)
4. Osmium //Bleihydroxid (vgl. Fig. 18)

Als zusammenfassendes Ergebnis der Untersuchung mit den verschiedenen Methoden, die eine selektive Kontrastierung im Sinne einer substanzspezifischen "Färbung" erlauben, kann gesagt werden:

- 1.) Eine selektive "Färbung" der die beiden verschiedenen Nukleinsäuren enthaltenden Strukturen ist möglich bei Verwendung von Aldehyden als erstes Fixierungsmittel. Hierbei muss in Kauf genommen werden, dass Membranstrukturen gar nicht oder nur unbefriedigend zur Darstellung kommen. Eine erste Fixierung mit Osmiumtetroxid führt regelmässig zu einer guten Erhaltung aller Strukturelemente der Zelle, schränkt aber die nach Aldehydfixierung zu beobachtende Selektivität der Kontrastierungsmittel ein. Nach beiden Fixierungsarten (Aldehydfixierung und Osmiumtetroxidfixierung) kann festgestellt werden, dass die selektive Wirkung einer zur Kontrastie-

runge benutzten Schwermetallverbindung umso geringer ist, je höher der pH-Wert der Kontrastierungslösung ist (DALTON und ZEIGEL<sup>18</sup>). Es konnte die von DALTON und ZEIGEL<sup>18</sup> gemachte Beobachtung bestätigt werden, dass mit zunehmendem pH-Wert der Schwermetallsalzlösung (gesättigte Uranylacetatlösung pH ungefähr 4,5; mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  neutralisierte Bleiacetatlösung pH = 7,2; Bleihydroxidlösung nach KARNOVSKY<sup>40</sup> pH = 10 - 11) eine Zunahme der Intensität der Kontrastierung und gleichzeitig eine Abnahme der relativen Kontrastunterschiede auftritt.

- 2.) Man muss bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterscheiden zwischen einer Darstellung der Struktur bei optimaler Erhaltung ihrer Feinstruktur und Methoden, die spezielle Aussagen über bestimmte Strukturen liefern, z.B. deren substantielle Zusammensetzung, wobei möglicherweise eine weniger gute Erhaltung der Gesamtstruktur in Kauf genommen werden muss. Die Anwendung derartiger Techniken kann jedoch neben der beabsichtigten Substanzanalyse zu weiteren Aufschlüssen über morphologische Feinheiten führen, die mit den Standardmethoden nicht zu erreichen sind. So konnte an dem von uns untersuchten Material einwandfrei der Nachweis geführt werden, dass es sich bei bestimmten, innerhalb des Kerns liegenden Einschlüssen um Anschnitte von tief in den Kern reichenden Plasmavaginagen handelt. Diese Beobachtungen sollen im Folgenden noch kurz diskutiert werden.

Bei der Durchmusterung der Bilder von Zellen der Lymphknoten der Ratte zeigten viele Kerne Einstülpungen des Zytoplasmas in verschiedener Form und Tiefe. Diese treten im elektronenmikroskopischen Bild nur zweidimensional auf. Räumlich gesehen stellen sie vielfach flächenförmige Eindellungen der Kernmembran dar und zerlegen so den Nukleus in einzelne Lappen und Segmente. Es ist indessen auffallend, dass neben den lichtmikroskopisch als segmentkernig bekannten Granulozyten auch bei Lymphoblasten, Lymphozyten und Plasmazellen, bei denen im histologischen Bild keine Segmentkerne

nachzuweisen sind, reichlich Invaginationen auftreten. Oft laufen die Invaginationen in verschiedenen Abständen fast parallel nebeneinander, oft sind sie unter verschiedenen Winkeln ins Kerninnere strebend zu beobachten. So entsteht der Eindruck, dass die einzelnen Kernsegmente nur durch dünne Karyoplasmabrücken zusammengehalten werden. Diese regelmässig zu machende Beobachtung könnte zu einer Modifikation unserer Vorstellungen über die physikalisch-chemische Konsistenz des Kerns derartiger Zellen führen. Unabhängig davon kann jedoch gesagt werden, dass eine derartige Kernstruktur eine bemerkenswerte Vergrösserung der Austauschfläche zwischen Karyoplasma und Zytoplasma zur Folge hat. Dies steht in guter Übereinstimmung damit, dass auf Grund der noch ablaufenden Zelldifferenzierung lebhafte Stoffaustauschvorgänge zwischen Zellkern und Zytoplasma angenommen werden müssen.

Es bleibt die Aufgabe, anhand von Serienschnitten zu untersuchen, wie sich die einzelnen Plasmataschen und Invaginationen im elektronenmikroskopischen Schnitt darstellen; nur so lässt sich der räumliche Verlauf rekonstruieren.

Die Fig. 25 zeigt, neben dem den Kern eindellenden Zytoplasma, einen isoliert im Nukleus liegenden Anschnitt. Die Anwesenheit der hier selektiv angefärbten Ribosomen ermöglicht den Nachweis, dass es sich um Anschnitte von Zytoplasmataschen handeln muss, Aus der in Fig. 25, 26, 27, 28, 29 gezeigten Zusammenstellung wird deutlich, wie stark die Kerne von Zytoplasmataschen durchzogen werden. Durch verschiedene Arten der Fixierung und Kontrastierung lassen sich die Strukturen recht gut identifizieren.

Der miteingestülpte Saum randständigen Chromatins begleitet in verschiedener Stärke die Plasmainvagination (vgl. Fig. 26b). Denkt man sich Schnitte durch die Plasmatschläuche gelegt, so erhält man leicht Ergebnisse, die den Bildern in Fig. 30 gleichen. Verschiedene Übergänge von Mikroplasmataschen mit noch deutlichem zytoplasmatischem Inhalt bis zu Tangentialschnitten durch den randständigen Chromatinsaum sind zu beobachten. Stellt man sich die Folge der Schnitte vor, die senkrecht zu dem in Fig. 26b getroffenen Invaginationen liegen, so muss es einen Schnitt geben, der

lediglich noch das "Chromatindach" trifft (vgl. Fig. 30II/f; 30III/f). Der zytoplasmatische Inhalt kann dann nicht mehr gesehen werden, und das eigentliche randständige Chromatin erscheint als Chromatinanhäufung im Kerninneren.

Die Doppelgebilde in Fig. 30 sind als Anschnitte einer Plasmataschenverzweigung zu erklären. An der Berührungsstelle der sich verzweigenden Invaginationen muss der Chromatinsaum verdickt sein; die Abb. Ia und Ib in Fig. 30 zeigen verschiedene Stadien, beziehungsweise unterschiedliche Weite der Verzweigung.

In Fig. 31 sind Plasmataschenquerschnitte unterschiedlicher Form bei Anwendung verschiedener Techniken dargestellt, die sich sehr der Form echter Nukleolen nähern. Während bei den Abb. Ia, IIa, IIIa, Ib und Id in Fig. 31 kaum Zweifel über den zytoplasmatischen Inhalt der querschnittenen Plasmataschen besteht, zeigen die Abb. IIb, IIIb, Ic, IIc, Id, IIIc, Ie, IId und IIId in Fig. 31 schon sehr grosse Ähnlichkeit mit echten Nukleolen. Der zum Teil tangential angeschnittene Chromatinsaum lässt sie aber als Plasmataschen erkennen.

Der Kern in Fig. 32 zeigt in seltener Vereinigung fast alle Formen der möglichen Anschnitte kleiner Plasmainvaginationen.

### Zusammenfassung

Darstellung der DNS- und RNS-Proteide im elektronenmikroskopischen Bild durch verschiedene Fixierungen und Kontrastierungen wird an Zellen des lymphoretikulären Gewebes studiert. Als Fixierungsmittel wurden Formol, Formol in Kombination mit Uranylacetat, Formol in Kombination mit Osmiumtetroxid, Osmiumtetroxid, sowie Glutaraldehyd verwendet. Als Kontrastmittel dienten Bleiacetat, Bleihydroxid, Uranylacetat, Osmiumtetroxid, Osmiumtetroxid gefolgt von Bleihydroxid, Kaliumpermanganat und Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid.

Die Verwendbarkeit der einzelnen Techniken für die Differenzierung der DNS-Proteide und der RNS-Proteide im elektronenmikroskopischen Bild wird dargelegt.

Der Vergleich der Kernstrukturen bei Anwendung der verschiedenen Techniken ermöglicht die Erklärung scheinbarer Kerneinschlüsse und nukleolenähnlicher Strukturen der Anschnitte von tiefen Plasmainvaginationen in das Kerninnere. Die verschiedenen Formen der intranuklear liegenden Anschnitte von Plasmabereichen werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 5. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart (1964).
2. BEER, M., ZOBEL, C. R.: Electrons stains. II. Electron microscope studies on the visibility of stained DNA-molecules. J. Mol. Biol. 3 (1961), 717-726.
3. BEHNKE, O.: Lysosomes in plasma cells in the propria of rat small intestine. J. Ultrastructure Res. 9 (1963), 395.
4. BENNETT, H. S.: Fine structure of cell nucleus, chromosomes, nucleoli and membrane. Revs. Modern Phys. 31 (1959), 297-300.
5. BENSCH, K. G., SABATINI, D. D., BARNETT, R. J.: New fixatives for cytochemistry and electron microscopy. Proc. 51st Ann. Meet. Internat. Academ. Path. Montreal (1962).
6. BERNHARD, W., HAGENAU, F., LEPLUS, R.: Coupes ultrafines d'éléments sanguins et de ganglion lymphatique étudiées au microscope électronique. Rev. Hémat. 10 (1955), 267-282.
7. BERNHARD, W., GRANBOULAN, N.: Ultrastructure of immunologically competent cells. Ciba Foundation Symposium, Cellular aspects of immunity. Little Brown and Co., Boston (1960), 92-117.
8. BESSIS, M.: Etudes sur la cellule réticulaire normale et pathologique. Rev. Hémat. 2 (1947), 395.
9. BESSIS, M. G.: Ultrastructure of lymphoid and plasma cells in relation to globulin and antibody formation. Lab. Inv. 10 (1961a), 1040-1067.
10. BORYSKO, E., BANG, F. B.: Structure of the nucleolus revealed by the electron microscope. Bull. Johns Hopkins Hosp. 89 (1951), 468-473.

11. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., PAKESCH, F.: Demonstration of cytoplasmatic structure in plasma cells. *Blood* 8 (1953), 916-922.
12. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., PAKESCH, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Plasmazellen im lymphoretikulären Gewebe. *Deutsch. Arch. Klin. Med.* 200 (1953b), 657-663.
13. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., PAKESCH, F.: Electron microscopy and the functional significance of a new cellular structure in plasmaocytes. A review. *Blood* 10 (1955), 650-654.
14. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., PAKESCH, F.: Electron microscopic investigations on sections from lymph nodes and bone marrow in malignant blood diseases. *Blood* 12 (1957), 278-294.
15. CAULFIELD, J. B.: Effects of varying vehicle for  $\text{OsO}_4$  in tissue fixation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3 (1957), 827-830.
16. CLARK, S. L.: The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *Am. J. Anat.* 110 (1962), 217-257.
17. DALTON, A. J.: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat. Rec.* 121 (1955), 281.
18. DALTON, A. J., ZEIGEL, R. F.: A simplified method of staining thin sections of biological material with lead hydroxyde for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7 (1960), 409-410.
19. EHRLICH, W. E.: Die Entzündung. *Handb. d. allgem. Pathologie*, Bd. VII/1. J. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1956).
20. ESSNER, E.: An electron microscopic study of erythrophagocytosis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7 (1960), 329-334.
21. FAGRAEUS, A.: Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta Med. Scand.* 130 Suppl. 204 (1948), 5-122.

22. FAGRAEUS, A.: Nomenclatur of immunobiologically competent cells. A Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspect of Immunity. Little Brown and Co., Boston (1960), 3.
23. FELDHERR, C. M.: The nuclear annuli as pathways for nucleoplasmatic exchanges. J. Cell Biol. 14 (1962), 65-72.
24. FRESSEN, O., WELLENSTIEK, H.J.: Zur elektronenmikroskopischen Struktur des Lymphknotens. Verhandl. deutsch. Ges. Pathol. 42 (1959), 359-365.
25. GRANBOULAN, N.: Etude au microscope électronique des cellules de la lignée lymphocytaire normale. Rev. Hémat. 15 (1960), 52-71.
26. GIBBONS, I. R., BRADFIELD, J. R. G.: The fixation of cell nuclei by osmium tetroxyd. Biochem. Biophys. Acta 22 (1956), 506-513.
27. GRUNDMANN, E.: Der morphologische Nachweis von zwei Lymphozytensystemen beim Menschen. Klin. Wschr. 37 (1959), 941.
28. HAN, S. S.: The ultrastructure of the lymph nodes. Anat. Rec. 136 (1960), 206 (Abstract).
29. HAN, S. S.: Ultrastructure of the mesenteric lymph node of the rat. Am. J. Anat. 109 (1961), 183-225.
30. HAN, S. S.: The reticular connective tissue cells of the spleen. V. Intern. Congr. for Electron Microscopy. Academ. Press. Inc. 111 5th Avenue, New York (1962), WW-8.
31. HAY, E. D., REVEL, J. P.: The DNA-component of the nucleolus viewed with electron microscope. Academ. Press Inc. New York, N.Y. (1962), 1-7.
32. HIRSCH, G. Ch.: Allgemeine Zellenlehre. Handbuch der Biologie, Bd. I. Akadem. Verlagsges. Athenain, Dr. Hachfeld, Konstanz (1964 noch im Erscheinen), 425-ff.

33. HOLT, S., HICKS, M.: Studies on formalin fixations for electron microscopy and cytochemical staining purposes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11 (1961), 37-45.
34. HORSTMANN, E.: Zur Elektronenmikroskopie des Nukleolus und Karyoplasmas. Verhandl. deutsch. Ges. Path. 41 (1958), 361-364.
35. HUXLEY, H. E., ZUBAY, G.: Preferencial staining of nucleic acid containing structures for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11 (1961), 273.
36. INMAN, D. R., COOPER, E. H.: Electron microscopy of human lymphocytes by phytohaem agglutinine. J. Cell. Biol. 19 (1963), 441-445.
37. JAMES, A., FREEMAN, B. S.: Cellular fine structure, an introductory student text and atlas. Copyright 1964 by Mc Graw-Hill, USA. Library and Congress Catalog Card number 64 -21014 (1964).
38. JORDAN, H. E.: The origin and fate of plasmaocytes. Anat. Rec. 119 (1954), 325.
39. JUNG, E., RIND, H., STOBBE, H.: Über Retikulozyten. Folia Haematolog. 75 (1958), 295-316.
40. KARNOVSKY, M.: Simple methods for staining with lead at high pH in electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11 (1961), 729-732.
41. KURTZ, S. M.: A new method for embedding tissues in Vestopal W. J. Ultrastructure Res. 5 (1961), 468-469.
42. LAWN, A. M.: The use of potassium permanganate as an electron-dense stain for sections of tissue embedding in Epoxy resin. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7 (1960), 197-198.
43. LEDUC, E., BERNHARD, W.: Ultrastructural cytochemistry. Enzyme and acid hydrolysis of nucleic acids and proteins. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10 (1961), 437.
44. LENNERT, K.: Lymphknoten, Bandteil A, Cytologie und Lymphadenitis. Handb. spez. path. Anatomie I/3A. Verlag J. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1961).

45. LEVER, J. D.: A method of staining sectioned tissues with lead for electron microscopy. *Nature* 186 (1960), 810-811.
46. LINDNER, J., GUSEK, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchung an Lymphknoten nach Dextranzufuhr. *Frankfurt. Z. Pathol.* 70 (1960), 367-388.
47. LOW, F. N., FREEMAN, J. A.: Electron microscopic atlas of normal and leukemic human blood. New York, Mc Graw-Hill (1958).
48. LUFT, J. H.: Permanganate. A new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 (1956), 799-802.
49. MARINOZZI, V., GAUTIER, A.: Fixations et colorations des affinités des composants nucléoprotéinique pour l'hydroxyde de plomb et l'acétate d'uranyle. *J. Ultrastructure Res.* 7 (1962), 436-451.
50. MARINOZZI, V.: Cytochimie ultrastructurale de nucléole-RNA et protéines intranucléolaires. *J. Ultrastructure Res.* 10 (1964), 433-456.
51. MAXIMOW, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. *Handb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen von Möllendorff.* J. Springer Verlag Berlin (1927), 232-583.
52. MILLER, J. F. A. P., OSOBA, D.: The immunologically competent cell. Churchill LTD. London (1963), S. 62.
53. MILLONIG, G.: Advantages of phosphate buffer for  $\text{OsO}_4$  solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* 32 (1961), 1637 (Abstract).
54. MILLONIG, G.: A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. biophys. biochem. Cytol.* 11 (1961), 736-739.
55. MOE, R.: Electron microscopic morphology of lymphatic sinuses. *Anat. Rec.* 136 (1960), 245 (Abstract).
56. MOE, H., BEHNKE, O., ROSTGAARD, J.: Staining of osmium fixed vestopal embedded tissue section for light microscopy. *Acta Anat.* 48 (1962), 142-148.

57. MOLLENHAUER, H. H., ZEBRUN, W.: Permanganate fixation of the Golgi complex and other cytoplasmatic structures of mammalian testes. J. biophys. biochem. Cytol. 8 (1960), 761-775.
58. NEIL, V. P., FERNANDO, H., MOVAT, Z.: Maturation of plasmacells after antigenic stimulation. V. Congress for electron microscopy. Copyright Academ. Press Inc. 1115th Avenue New York (1962), TT-10.
59. NOWELL, P., BERWICK, L.: The surface ultrastructure of normal and leucemic rat lymphocytes. Cancer Res. 18 (1958), 1067-1069.
60. PALADE, G.: A study of fixation for electron microscopy. J. exper. Med. 95 (1952), 285-298.
61. PARSONS, D. F.: A simple method for obtaining increased contrast in aradite sections by using postfixation staining of tissues with potassium permanganate. J. biophys. biochem. Cytol. 11 (1961), 492-497.
62. POLICARD, A., COLLET, A., MARTIN, J. C.: Recherches au microscope électronique sur diverses infrastructures des voies sanguines des ganglions lymphatiques. Z. Zellforsch. 56 (1962), 203-212.
63. PORTER, K. R., KALIMANN, F.: The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exp. Cell Res. 4 (1953), 127-141.
64. REINAUER, H.: Morphologische Befunde an Lymphknoten bei infektiöser Mononukleose. Arch. pathol. anatom. Physiol. Virchows 332 (1959), 56-82.
65. ROBERTS, J. C., DIXON, J. F. J., WEIGLER, W. O.: Antibody producing lymph node cells and peritoneal exudate cells. A.M.A. Arch. Path. 64 (1957), 324-332.
66. ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark. 3. Aufl. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1960).
67. SABATINI, D., BENSCH, K., BARNETT, R. J.: New fixatives for cytological and cytochemical studies. V. Internat. Congr. for Electron Microscopy. Copyright 1962 Academ. Press Inc. 111, Vth Avenue New York 3, N.Y. (1962).

68. SABATINI, D., BENSCH, K., BARNETT, R. J.: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17 (1963), 19-58.
69. SABATINI, D., MILLER, F., BARNETT, R. J.: Aldehyde fixation for morphological and enzyme histochemical studies with the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.* vol. 12, number 2 (1964), 57-71.
70. SCHULTZE, H. E.: Der neueste Stand der Plasmaprotein-forschung. *Medizin. Grundlagenforschung III* (1960), 352-441.
71. SORENSON, G. D.: An electron microscopic study of pro-pliteal lymph nodes from rabbits. *Am. J. Anat.* 107 (1960), 73-96.
72. STENDER, H. St.: Milz und Lymphknoten in: *Strahlenpathologie der Zelle, Beiträge zur Zyto- und Histopathologie der Strahlenwirkung.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1963).
73. STOECKENIUS, W.: Zytomorphologische Untersuchungen am lymphatischen Gewebe. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* 96 (1957), 399.
74. STOECKENIUS, W., NAUMANN, P.: Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Antikörperbildung in der Milz. *Proc. VI. Cong. Europ. Soc. Haemat.* 2 (1957), 84-89.
75. STOECKENIUS, W.: Weitere Untersuchungen am lymphatischen Gewebe. *Verhandl. deutsch. Ges. Pathol.* 41 (1958), 304-311.
76. STICH, H.: Bau und Funktion der Nukleolen. *Experientia* 12 (1956), 7-14.
77. SUNDBERG, R. O.: Lymphocytes: Origin, structure and inter-relationships in lymphocyte and lymphocytic tissue. *J. W. Rebusk, ed. Paul B. Hoeber, Inc., New York* (1960).
78. SWIFT, H., ADAMS, B. J.: Simple methods for nucleic acid and acid mucopolysaccharide localisation in electron microscopy. *Academ. Press. New York* 3 N.Y. (1962), 1-4.
79. THIERY, Y. J. P.: L'ergastoplasme des plasmocytes à l'état vivant. *Rev. Hémat.* 10 (1955), 745-752.

80. THIERY, Y. J. P.: Etude sur les plasmocytes en contrast de phase et en microscopie électronique. III. Plasmocytes à corp de Russel et à cristeaux. Rev. Hémat. 13 (1958), 61-78.
81. THIERY, Y. J. P.: Microcinematographic contributions to the study of plasma cells. Ciba Foundation Symposion. Cellular aspects of immunity. Brown and Co. Boston (1960), 50-91.
82. THOENNES, W.: Fett im Nukleolus. J. Ultrastructure Res. 10 (1964), 194-206.
83. TROWELL, O. A.: The lymphocyte. Int. Rev. Cytol. 7 (1958), 253-293.
84. WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. biophys. biochem. Cytol. 4 (1958), 475-478.
85. WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. J. biophys. biochem. Cytol. 4 (1958), 727-730.
86. WELSH, R. A.: Electron microscopic localisation of Russel bodies in the human plasma cell. Blood 16 (1960), 1307.
87. WETZEL, B. K.: Sodium permanganate fixation for electron microscopy. J. biophys. biochem. Cytol. 3 (1961), 711-716.
88. WINTER, H.: Zytologische Untersuchungen reaktiver Änderungen des Lymphknotenbildes im Tierexperiment. Giessen (1959).
89. YASUZUMI, G., SAWADA, T., SUGIHARA, Y. R., KIRIYAMA, M., SUGIOKA, M.: Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. Z. Zellforsch. 48 (1958), 10-23.
90. YOFFEY, J. M., COURTICE, F. C.: Lymphatics, lymph and lymphoid tissue. Edward Arnold Ltd., London, ed. 2 (1956).
91. YOFFEY, J. M.: The lymphomyeloid complex. Ciba Foundation Sympos. Haemopoiesis, Churchill, London (1960).

92. ZAPF, K., LUDVIK, J.: Einführung in die elektronen-  
mikroskopische Präparationstechnik in der Mikro-  
biologie. Verlag G. Fischer, Jena (1961).
93. ZLOTNICK, A., GERICHTER, C. D., NIR, I.: Experimentelle  
Produktion von "grape cells" und ihre Beziehung zu  
den Serum-Gamma-Globulinen und Serummucoiden. Blood 14  
(1959), 14.
94. ZUCKER-FRANKLIN, D.: The Ultrastructure of Cells in  
Human Thoracic Duct Lymph. J. Ultrastructure Res. 9  
(1963), 325-339.

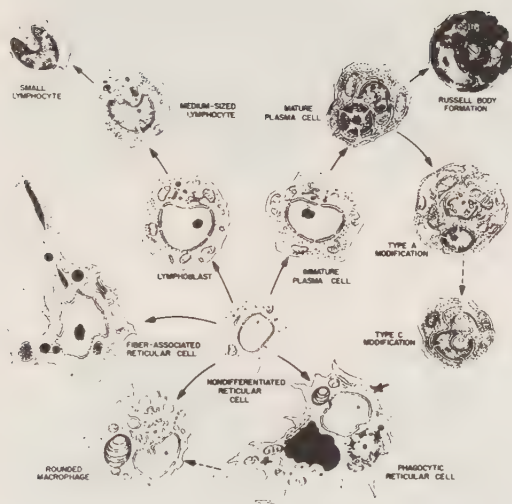


Fig. 1. Schema aus HAN<sup>23</sup> (S. 187), die Verwandtschaft der Zellen im Lymphknoten darstellend. Die zelluläre Umwandlung und die Differenzierungsmöglichkeiten werden durch Pfeile dargestellt unter dem Hinweis, dass über die Richtung der Umwandlung nichts Endgültiges ausgesagt werden kann.

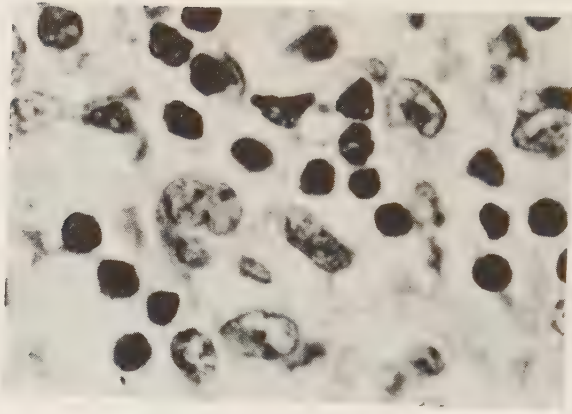


Fig. 2a

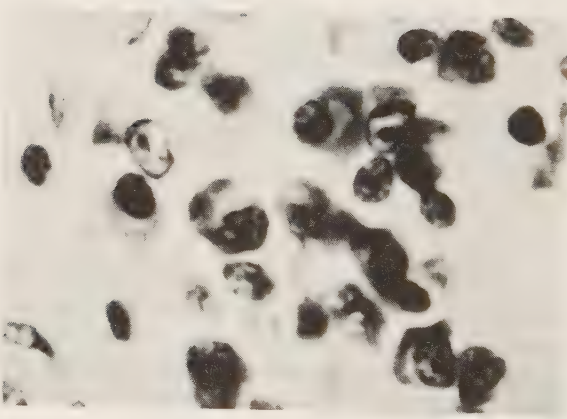


Fig. 2b

Fig. 2a, 2b. Retikulumzellen, Lymphozyten und Plas-  
mazellen aus dem Lymphknoten der Ratte. Hämalaun  
(Mayer) kombiniert mit Giemsaefärbung.

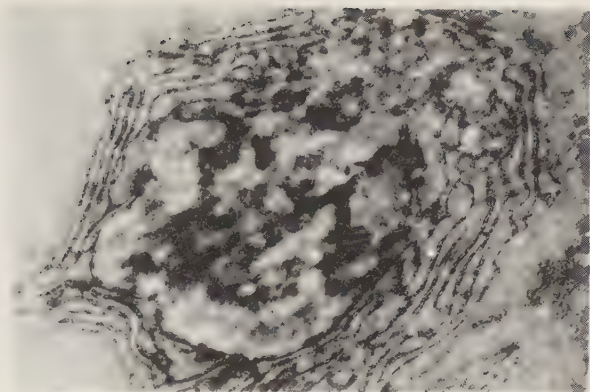


Fig. 3

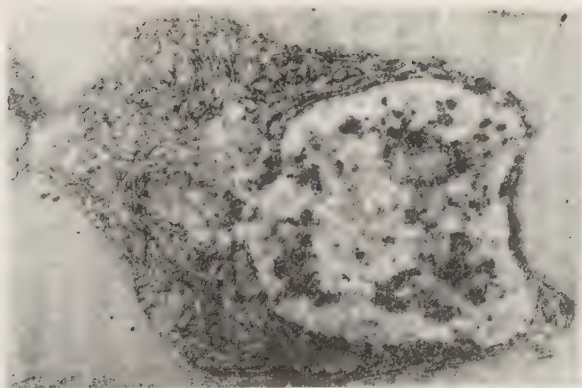


Fig. 4

Fig. 3, Fig. 4. Plasmazellen aus dem Lymphknoten der Ratte formolfixiert, kontrastiert mit Bleiacetat. Das Chromatin ist nicht kontrastiert, die interchromatische Substanz tritt hervor. Die Ribosomen sind gut zu erkennen, während Membranen nicht zur Darstellung kommen.

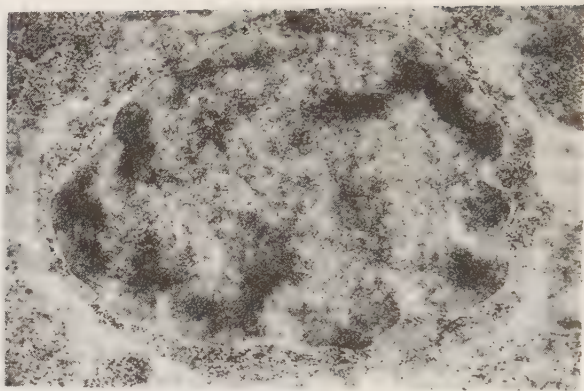


Fig. 5. Lymphozyt aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Formol, Kontrastmittel Bleihydroxid. Das Chromatin unterliegt vermutlich einer teilweisen Extraktion.

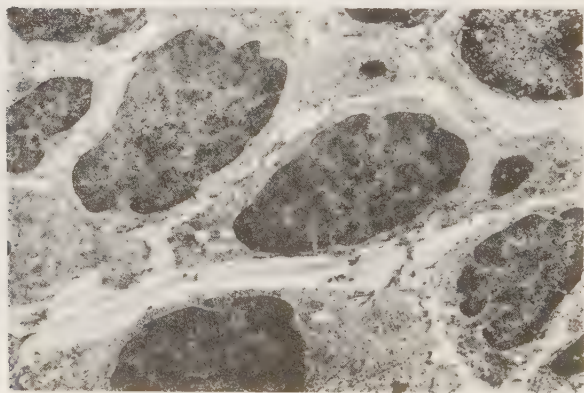


Fig. 6. Retikulumzellen aus dem Lymphknoten der Ratte in verschiedenen Differenzierungs- und Reifungsstadien. Formolfixierung, Kontrastierung mit Uranylacetat. Das Chromatin erscheint sehr stark kontrastiert, die interchromatische Substanz wird deutlich.

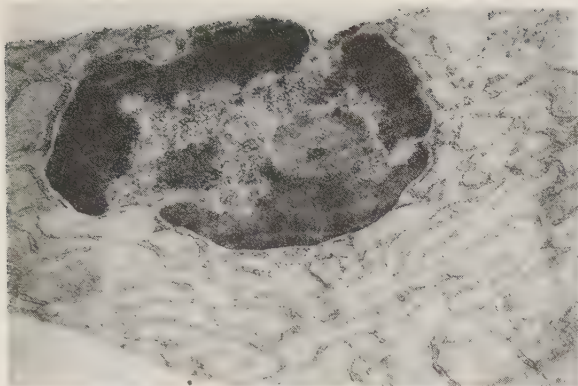


Fig. 6a. Plasmazelle aus dem Lymphknoten der Ratte. Formolfixierung, Kontrastierung mit Uranylacetat. Das elektronendichte Chromatin hebt sich deutlich vom schwach kontrastierten Nukleolus und von den Ribosomen ab.

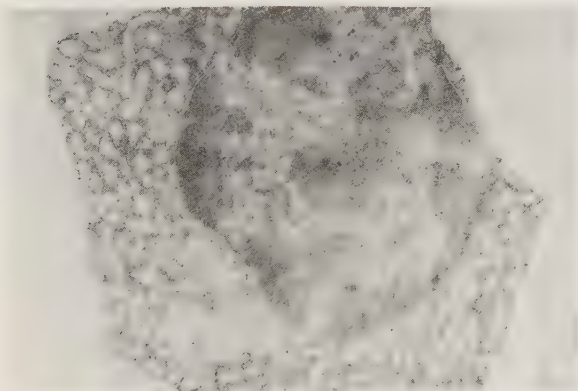


Fig. 7. Plasmazelle aus dem Lymphknoten der Ratte. Formolfixierung, Kontrastierung mit Osmiumtetroxid. Der Nukleus ist wenig kontrastiert. Trotz Fehlens der lamellären Strukturen wird das Ergastoplasma deutlich durch den guten Kontrast der Ribosomen. Erwähnenswert ist die Leere im Bereich der Golgizone.

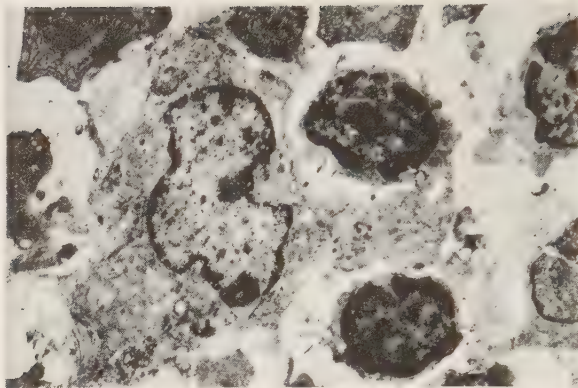


Fig. 8. In der Mitte eine Retikulumzelle, darunter Lymphozyten; oben rechts eine angeschnittene Plasmazelle, aus dem Rattenlymphknoten. Formolfixierung, Kontrastierung mit Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid. Das tiefschwarze Chromatin hebt sich von der hellen interchromatischen Substanz, die gut dargestellt ist, ab. Beachtenswert ist der Reichtum an Einschlussmaterial und die gute Darstellung des Kollagens.

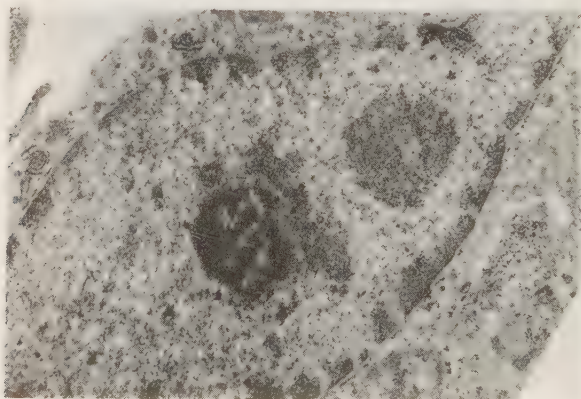


Fig. 9. Retikulumzelle aus dem Rattenlymphknoten. Fixierung mit Formol, Kontrastierung Osmiumtetroxid, gefolgt von Bleihydroxid. Die Intensität des Chromatins ist schwach im Vergleich zu den Ribosomen und dem sehr gut kontrastierten Nukleolus.

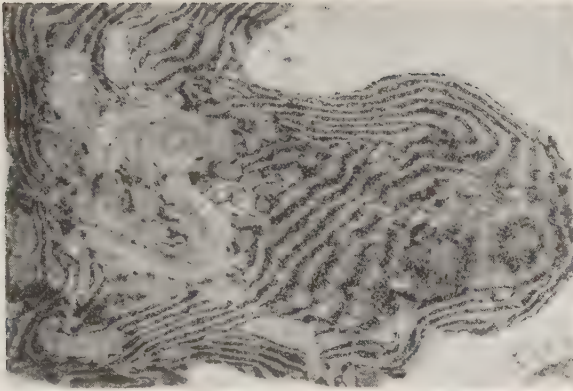


Fig. 10. Plasmazelle aus dem Rattenlymphknoten. Formolfixierung, Kontrastierung mit Osmiumtetroxid gefolgt von Bleihydroxid. Beachtenswert ist die eigenartige Darstellung des Golgifeldes, das sich trotz Fehlens der lamellären Strukturen gut abhebt.

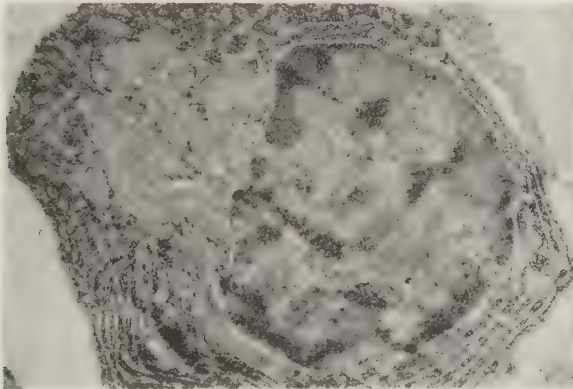


Fig. 11. Plasmazelle aus dem Lymphknoten der Ratte. Formolfixierung, kontrastiert mit Osmiumtetroxid gefolgt von Bleihydroxid. Die Intensität der Ribosomen ist kräftiger als die des elektronendichten Chromatins. Die Golgizone ist frei.

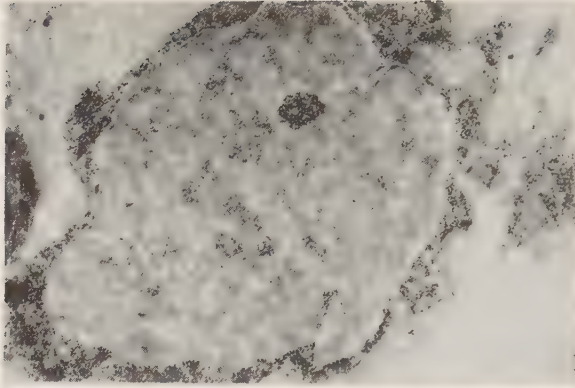


Fig. 12. Lymphozyt aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Formol gefolgt von Uranylacetat, Kontrastierung mit Bleiacetat. Der fast nicht kontrastierte Nukleus lässt deutlich plasmatische Invaginationen erkennen. Die Ribosomen allein sind kräftig kontrastiert, der Nukleolus wird nicht dargestellt.

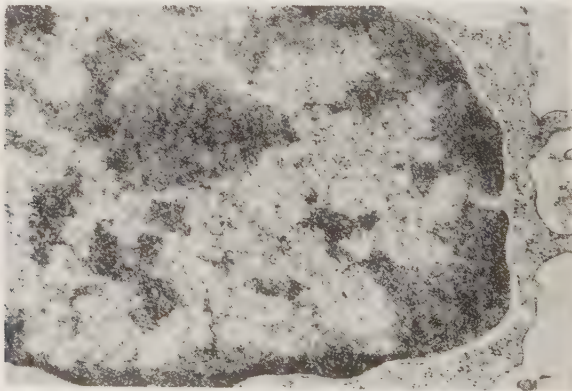


Fig. 13. Lymphozyt aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung Formol gefolgt von Uranylacetat; Kontrastierung mit Bleihydroxid. Das Chromatin fällt durch starken Kontrast auf, die interchromatische Substanz durchbricht kanalartig das Chromatin.

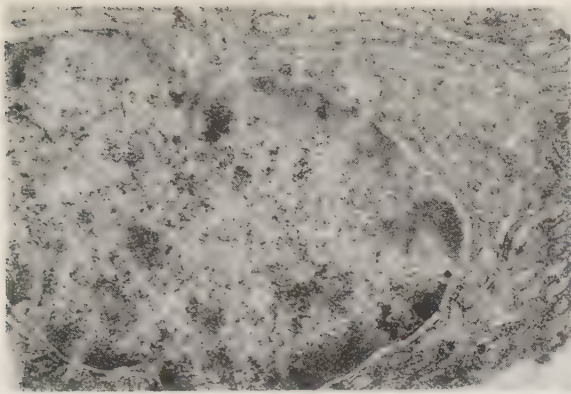


Fig. 14. Plasmazelle aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung Formol gefolgt von Uranylacetat, kontrastiert mit Uranylacetat. Der relative Kontrast zwischen dem Chromatin und den Ribosomen mit geringerer Dichte ist kenntlich.

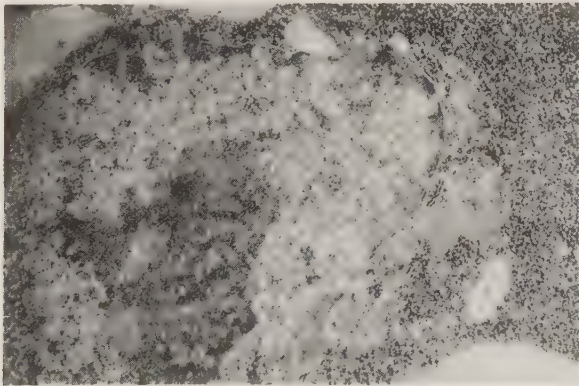


Fig. 15. Vermutlich eine basophile Stammzelle aus dem Rattenlymphknoten, eine Vorstufe der Lymphoblasten in der Pulpa und der Plasmoblasten (LENNERT<sup>44</sup>). Fixierung mit Formol gefolgt von Uranylacetat, Kontrastierung mit  $\text{KMnO}_4$ . Der Nukleolus und die Ribosomen heben sich durch starken Kontrast von dem kaum dargestellten Chromatin ab.

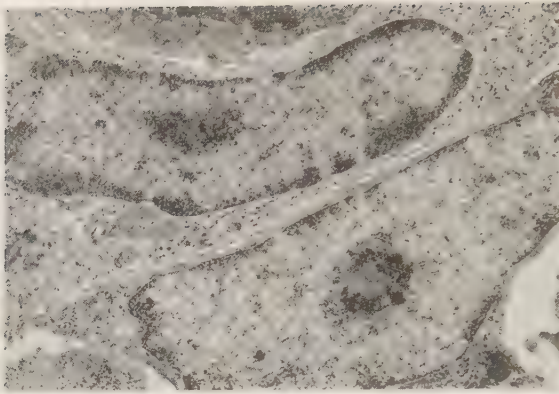


Fig. 16. Retikulumzellen aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung Formol gefolgt von Osmiumtetroxid, kontrastiert mit Bleihydroxid. Die guten Kontrastunterschiede der Kernbestandteile sind nur durch Unterschiede in der Lagerungsdichte der gleich stark kontrastierten Granula bedingt.

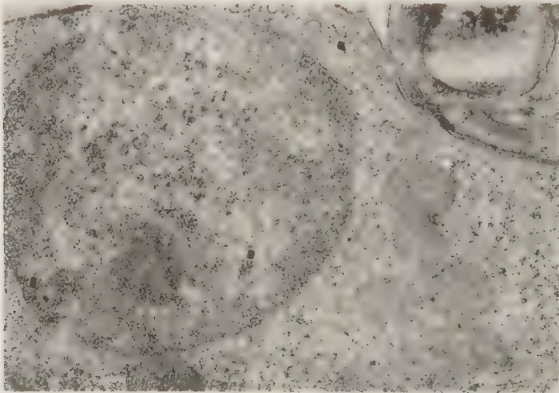


Fig. 17. Früher Lymphoblast aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixiert mit Osmiumtetroxid, Kontrastierung mit Bleiacetat. Die Technik gibt ein klares Bild aller zellulären Strukturen, die Kontrastunterschiede im Nukleus werden durch die Lagerungsdichte der Granula hervorgerufen. Der Nukleolus ist erkennbar.

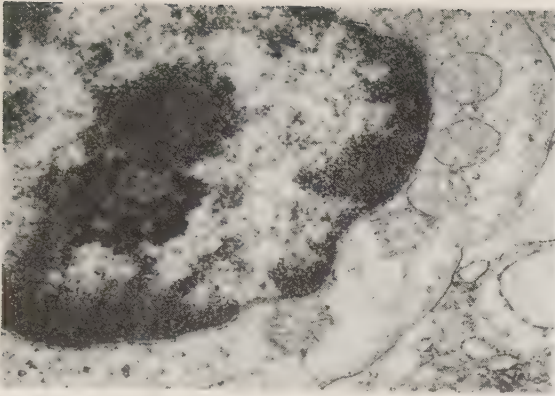


Fig. 18. Lymphozyt aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Osmiumtetroxid, Kontrastmittel Bleihydroxid. Die Technik stellt alle zellulären Komponenten hervorragend dar, gestattet aber nicht, die Nukleoproteide zu differenzieren.

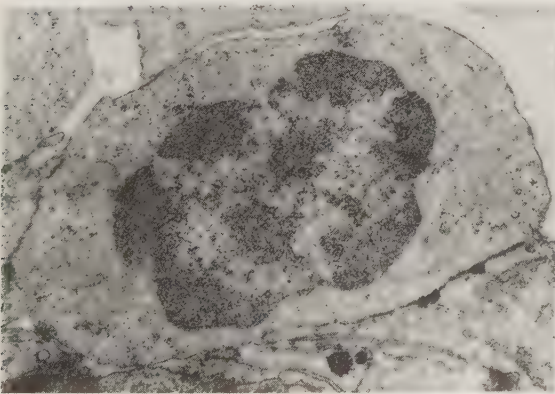


Fig. 19. Lymphoblast aus dem Lymphknoten der Ratte. Osmiumtetroxidfixierung, Kontrastierung mit Uranylacetat. Die Granula des Nukleus sind verschieden intensiv kontrastiert, intranukleäre Kanäle sind sichtbar.

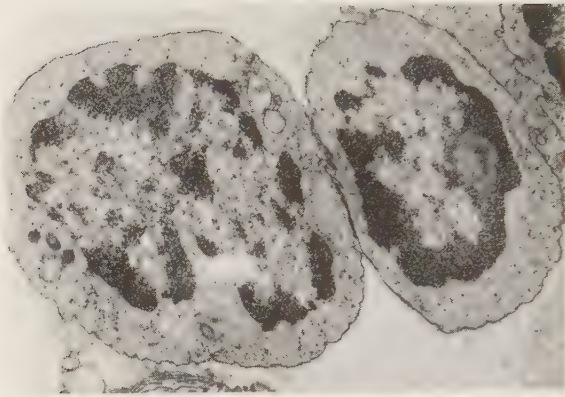


Fig. 20. Lymphozyten aus dem Lymphknoten der Ratte. Osmiumtetroxidfixierung, Kontrastierung mit Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid. Diese Technik gestattet bei Darstellung aller zellulären Elemente die Nukleoproteide zu differenzieren.

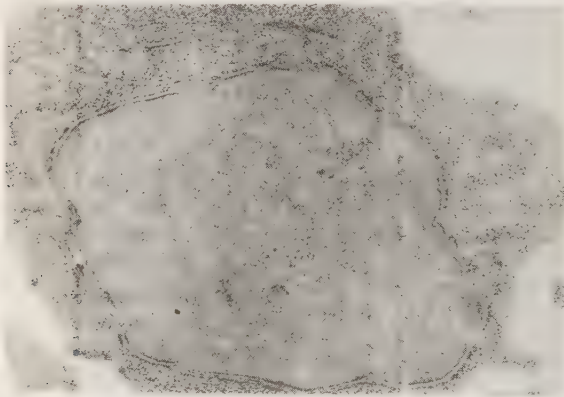


Fig. 21. Früher Plasmoblast aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Glutaraldehyd, Kontrastierung mit Bleiacetat. Bei geringer Elektronendichte des Kernes sind die Ribosomen intensiv kontrastiert. Auffallend ist die starke Kontrastierung der inneren Kernhülle.

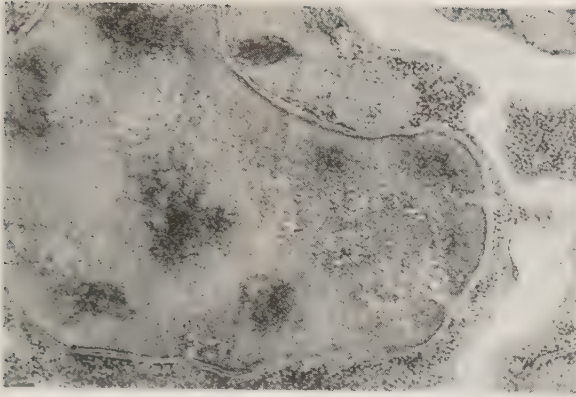


Fig. 22. Lymphozyt aus dem Rattenlymphknoten. Fixierung mit Glutaraldehyd, Kontrastierung mit Bleiacetat. Zwischen der inneren Kernhülle und dem Ergastoplasmarand befindet sich der perinukleäre Raum, in dessen Innerem eine kontrastierte, anscheinend lineare Struktur sichtbar ist. Kernkanäle sind deutlich.

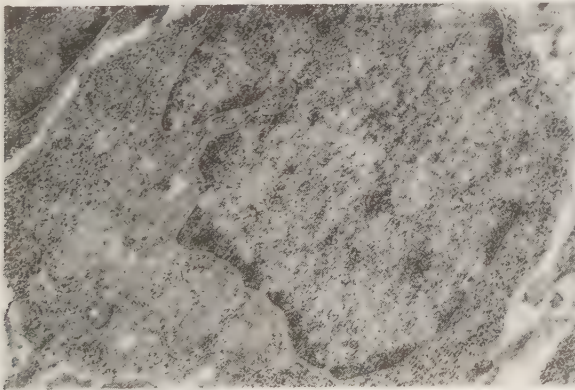


Fig. 23. Retikulumzelle (?) aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Glutaraldehyd, Kontrastierung mit Bleihydroxid. Die sehr intensiv kontrastierten Ribosomen heben sich deutlich von dem weniger kontrastreichen Chromatin und der interchromatischen Substanz ab. Beachtenswert ist die Darstellung des Kernrandes und des perinukleären Raumes.

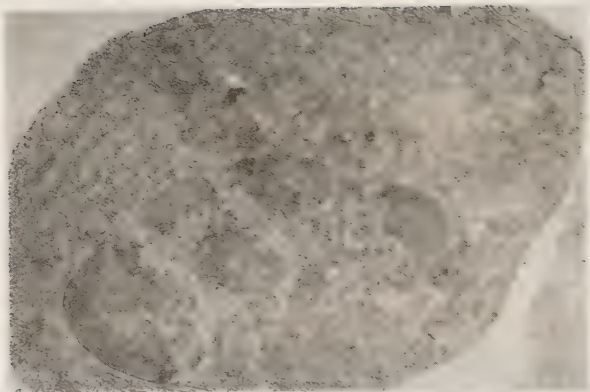
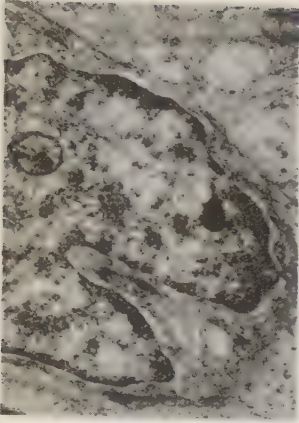
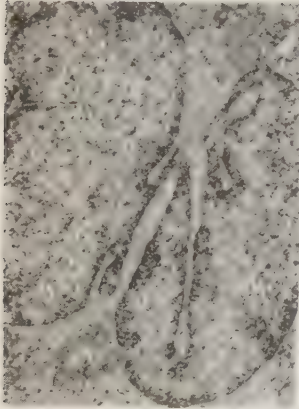


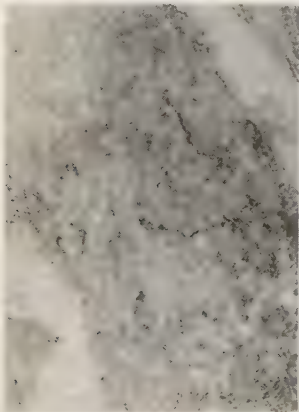
Fig. 24. Plasmazelle aus dem Lymphknoten der Ratte. Fixierung mit Glutaraldehyd, Kontrastierung mit Uranylacetat. Das elektronendichte Chromatin liegt hauptsächlich am Kernrand, die internukleäre Substanz zeigt helle, das Chromatin durchbrechende Kanäle, die zum Kernrand ziehen.



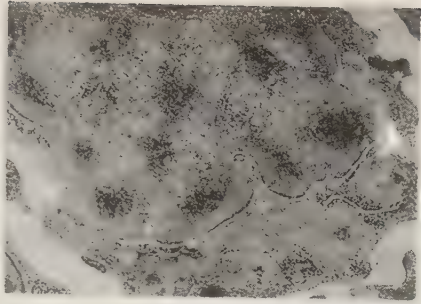
**Fig. 25**



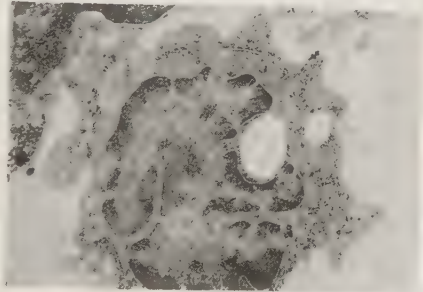
**Fig. 27**



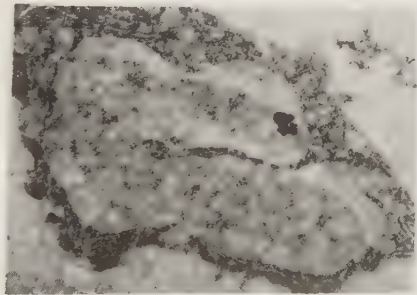
**Fig. 29**



**Fig. 26a**



**Fig. 26b**

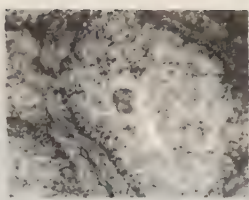
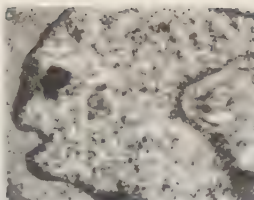
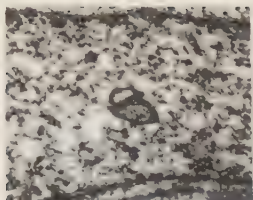


**Fig. 28**

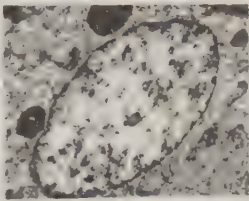
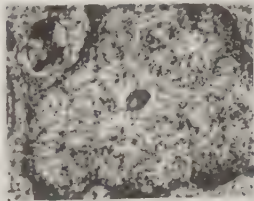
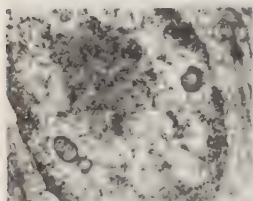
Aus den Fig. 25 bis 29 wird deutlich, wie stark die Kerne der Zellen des Rattenlymphknotens von Zytoplasmataschen durchzogen werden. Möglicherweise ist unsere Vorstellung von der physikalisch-chemischen Konsistenz des Nukleus noch nicht vollständig.

Fig. 30. Plasmainvaginationen durchziehen in verschiedener Form die Kerne der Zellen des Rattenlymphknotens. Der miteingestülpte Saum des randständigen Chromatins ist deutlich zu erkennen. Am Ende einer Invagination trifft der Schnitt nur das "Chromatindach".

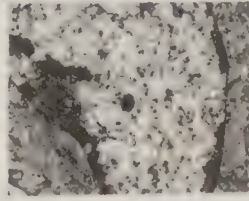
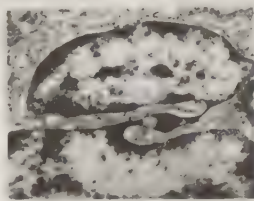
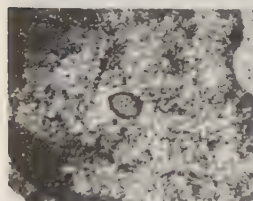
a



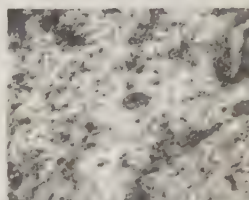
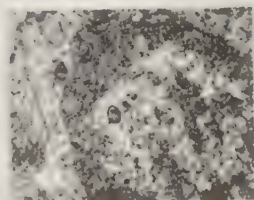
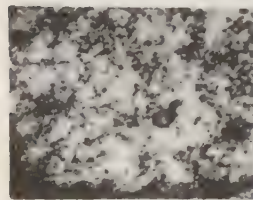
b



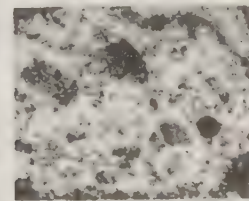
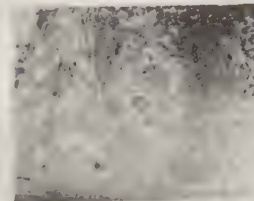
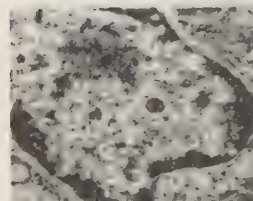
c



d



e



f

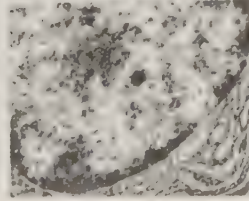
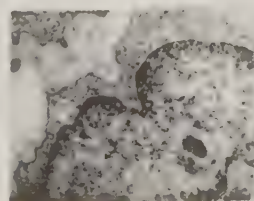
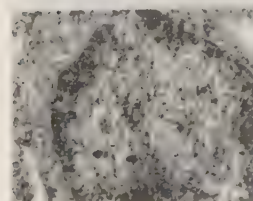


Fig. 31. Plasmataschen in den Kernen der Zellen  
des Rattenlymphknotens. Trotz der sehr grossen  
Ähnlichkeit einiger Bilder mit Nukleolen lässt  
das miteingestülpte Chromatin nur die Deutung als  
Plasmainvagination zu.

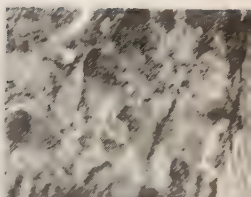
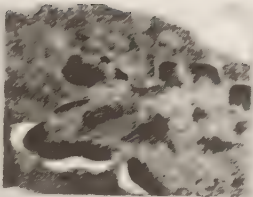
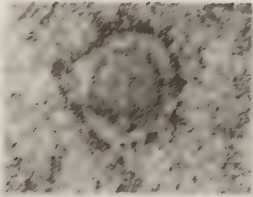
Fig. 31

I

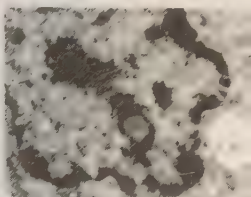
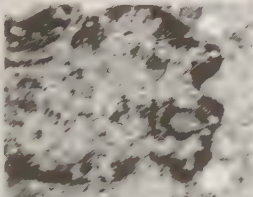
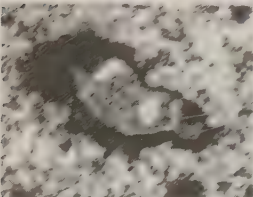
II

III

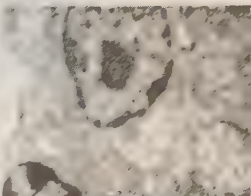
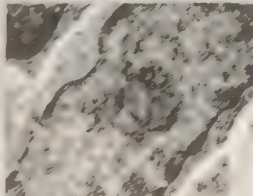
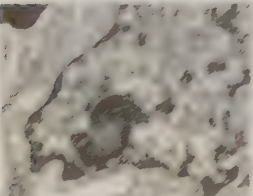
a



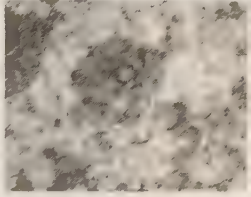
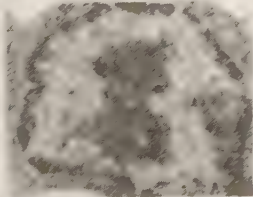
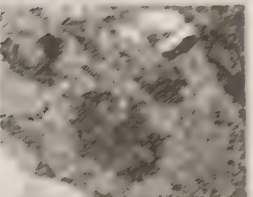
b



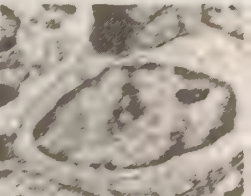
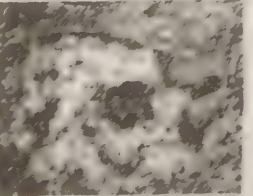
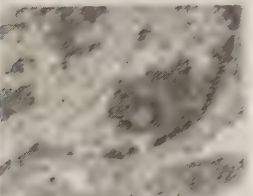
c



d



e



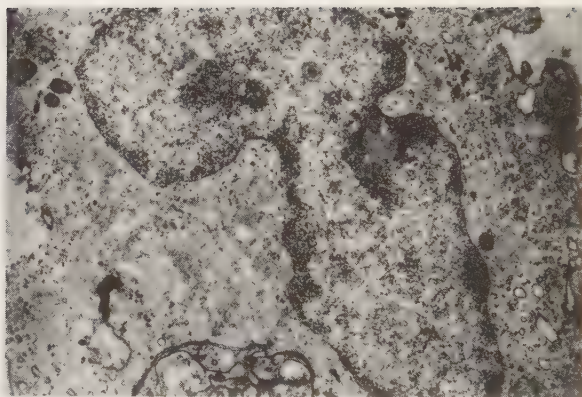


Fig. 32. Fixierung mit Osmiumtetroxid, Kontrastierung mit Uranylacetat gefolgt von Bleihydroxid. In seltener Vereinigung sind fast alle Formen der möglichen Anschnitte kleiner Plasmainvaginationen im Nukleus dargestellt.

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung der Herren Prof. Dr. med. Hans Stephan STENDER und Prof. Dr. Wolrad VOGELL. Für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit möchte ich beiden Herren herzlich danken. Die technischen Arbeiten führte meine Schwester Ingilt Pfab aus.

### Lebenslauf

Als Sohn des Studienrates Dr. Leo Pfab und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Berger, wurde ich am 23. Mai 1939 in Mährisch-Schönberg/Sudetenland geboren. Im Februar 1946 wurde ich aus meiner Heimat vertrieben und in Münden, Kreis Waldeck (Hessen), angesiedelt, wo ich bis März 1948 die Volksschule besuchte. Nach der Übersiedlung meiner Eltern nach Frankenberg/Eder kam ich bis zum 31. März 1950 auf die dortige Volksschule. Am 1. April 1950 trat ich in das Realgymnasium Edertalschule in Frankenberg/Eder ein, am 5. März 1960 legte ich hier die Reifeprüfung ab.

Mein Medizinstudium begann ich am 25. April 1960 an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Hier legte ich am 8. März 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 5. März 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Anschliessend belegte ich an der Philipps-Universität Marburg die klinischen Fächer und bestand im Wintersemester 1966/67 das medizinische Staatsexamen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren

|                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| Prof. Dr. G. Beckmann               | Doz. Dr. Dr. Salfeld   |
| Prof. Dr. Bickel                    | Prof. Dr. Sauer        |
| Prof. Dr. Berendes                  | Prof. Dr. Schiff       |
| Doz. Dr. Bommer                     | Prof. Dr. Schleyer     |
| Prof. Dr. O. Braun-Falco            | Prof. Dr. W. Schmid    |
| Prof. Dr. Buchholz                  | Prof. Dr. Schölmerich  |
| Prof. Dr. Th. Bücher                | Prof. Dr. M. Schwaiger |
| Prof. Dr. Dimroth                   | Prof. Dr. Seidel       |
| Prof. Dr. Drawert                   | Prof. Dr. Siegert      |
| Prof. Dr. Exner                     | Prof. Dr. M. Siess     |
| Prof. Dr. Gedigk                    | Prof. Dr. Stender      |
| Prof. Dr. H. Grebe                  | Prof. Dr. Straub       |
| Prof. Dr. Hamm                      | Prof. Dr. Streicher    |
| Prof. Dr. Dr. Heuser                | Prof. Dr. Vogell       |
| Prof. Dr. H. Hensel                 | Prof. Dr. Walcher      |
| Doz. Dr. Hess                       | Prof. Dr. Wendt        |
| Prof. Dr. Jacob                     | Prof. Dr. Würterle     |
| Prof. Dr. Klingenberg               |                        |
| Prof. Dr. Lang                      |                        |
| Prof. Dr. Linneweh                  |                        |
| Prof. Dr. Löhr                      |                        |
| Prof. Dr. Mahr                      |                        |
| Prof. Dr. Mann                      |                        |
| Prof. Dr. G. A. Martini             |                        |
| Prof. Dr. Marx                      |                        |
| Prof. Dr. Mattes                    |                        |
| Prof. Dr. Maurath                   |                        |
| Prof. Dr. R. du Mesnil de Rochemont |                        |
| Prof. Dr. Neubauer                  |                        |
| Prof. Dr. Niessing                  |                        |
| Prof. Dr. Petry                     |                        |
| Prof. Dr. Rodeck                    |                        |
| Prof. Dr. Rohen                     |                        |





